

Akute Transplantatabstoßung

Expressionskinetik unterschiedlicher Mediatoren
der akuten Transplantatabstoßung

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Pia Kranich
Geburtsort Friedberg

Gießen 2005

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Abteilung Kardiologie/Angiologie
Sonderforschungsbereich Kardiopulmonales Gefäßsystem (547)
Leiter: Prof. Dr. H. Tillmanns

Gutachter: PD Dr. H. Hölschermann

Gutachter: Prof. Dr. R. Weimer

Tag der Disputation: 22.02.2006

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Diagrammverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Geschichte der Transplantation	1
1.2 Entwicklung der klinischen Herztransplantation	2
1.3 Begriffsdefinition der Transplantation	4
1.4 Grundlagen der Transplantationsimmunologie	4
1.5 Mechanismus der akuten Transplantatabstoßung	9
1.5.1 Klinische Charakterisierung der akuten Abstoßung	10
1.6 Mediatoren der akuten Abstoßung	11
1.6.1 Adhäsionsmoleküle	11
1.6.2 Interleukine	15
1.6.2.1 Interleukin-2 (IL-2)	15
1.6.2.2 Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R)	16
1.6.2.3 Interleukin-1 (IL-1)	17
1.6.2.4 Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	18
1.6.3 Chemokine	18
1.6.3.1 Monocyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)	20
1.6.3.2 RANTES	21
1.7 Ziel der Arbeit	22
2 Material und Methode	24
2.1 Versuchstiere	24
2.1.1 Herkunft der Tiere	24
2.1.2 Tierhaltung	24
2.2 Tiermodell	25
2.2.1 Narkose	25
2.2.2 Operationsvorbereitung	25

2.2.3	Operatives Vorgehen	26
2.2.3.1	Vorbereitung des Empfängertieres	26
2.2.3.2	Entnahme des Transplantats	26
2.2.3.3	Transplantation	27
2.2.3.4	Blutflussrichtung im Transplantat	28
2.2.4	Transplantatfunktion	29
2.2.5	Gruppendesign	30
2.2.6	Probenaufbereitung	31
2.3	Immunhistochemie.....	32
2.3.1	Histologische Aufarbeitung	32
2.3.1.1	Standardfärbung.....	32
2.3.1.2	Immunhistochemische Färbung	32
2.4	Molekularbiologie	36
2.4.1	Aufarbeitung der Proben.....	36
2.4.2	RNA-Isolierung	36
2.4.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	37
2.4.4	Reverse-Transkription	38
2.4.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	39
2.4.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten.....	43
2.5	Statistik	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Transplantatüberleben.....	45
3.2	Akute Transplantatabstoßung.....	46
3.2.1	Kinetik der akuten Transplantatabstoßung auf histologischer und immunhistochemischer Ebene	46
3.2.1.1	T-Zell Infiltration.....	48
3.2.1.2	Monozyten/Makrophagen Infiltration.....	51
3.2.1.3	Kinetik der ICAM-1 Expression.....	53
3.2.1.4	Kinetik der VCAM-1 Expression	56
3.2.2	Kinetik der akuten Transplantatabstoßung auf molekularbiologischer Ebene	59
3.2.2.1	Kinetik der ICAM-1 Genexpression.....	59
3.2.2.2	Kinetik der VCAM-1 Genexpression	61
3.2.2.3	Kinetik der IL-2 Genexpression.....	63
3.2.2.4	Kinetik der IL-2R Genexpression.....	65
3.2.2.5	Kinetik der IL-1 β Genexpression.....	67
3.2.2.6	Kinetik der TNF- α Genexpression.....	69
3.2.2.7	Kinetik der MCP-1 Genexpression.....	71
3.2.2.8	Kinetik der RANTES Genexpression	73

4	Diskussion	75
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
4.2	Transplantatabstoßung	77
4.3	Zelluläre Infiltration im zeitlichen Verlauf	77
4.4	Adhäsionsmoleküle	77
4.5	T-Zell und Monozyten/Makrophagen Infiltration.....	80
4.6	Interleukine	82
4.6.1	IL-2	82
4.6.2	IL-2 Rezeptor	83
4.6.3	IL-1	84
4.6.4	TNF- α	85
4.7	Chemokine	85
4.7.1	MCP-1.....	86
4.7.2	RANTES	87
4.8	Ausblick	89
5	Zusammenfassung	90
6.	Summary.....	93
	Literaturverzeichnis	X

Appendix

Erklärung

Lebenslauf

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel	12
Abbildung 2: Adhäsion von einer T-Zelle mit dem Endothel	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der heterotopen Herztransplantation	28
Abbildung 4: Der APPAP-Komplex	32
Abbildung 5: Prinzip der Reversen Transkription	37
Abbildung 6: Prinzip Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
Abbildung 7: Regulation des internen Standard-Gens β -Aktin	46
Abbildung 8: H&E Färbung, Infiltration des Transplantats	50
Abbildung 9: Immunhistochemie R73 positive Zellen	53
Abbildung 10: Immunhistochemie ED1 positive Zellen	55
Abbildung 11: Immunhistochemie ICAM-1	58
Abbildung 12: Immunhistochemie VCAM-1	61
Abbildung 13: PCR-Banden von ICAM-1 und internen Standard	63
Abbildung 14: PCR-Banden von VCAM-1 und internen Standard	65
Abbildung 15: PCR-Banden von IL-2 und internen Standard	67
Abbildung 16: PCR-Banden von IL-2R und internen Standard	69
Abbildung 17: PCR-Banden von IL-1 β und internen Standard	71
Abbildung 18: PCR-Banden von TNF- α und internen Standard	73
Abbildung 19: PCR-Banden von MCP-1 und internen Standard	75
Abbildung 20: PCR-Banden von RANTES und internen Standard	77
Abbildung 21: Schematische Darstellung der akuten Transplantatabstoßung	93

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Transplantatüberleben	48
Diagramm 2: Immunhistochemie R73 positive Zellen	52
Diagramm 3: Immunhistochemie ED1 positive Zellen	54
Diagramm 4: Immunhistochemie ICAM-1	57
Diagramm 5: Immunhistochemie VCAM-1	60
Diagramm 6: Genexpression von ICAM-1	62
Diagramm 7: Genexpression von VCAM-1	64
Diagramm 8: Genexpression von IL-2	66
Diagramm 9: Genexpression von IL-2R	68
Diagramm 10: Genexpression von IL-1 β	70
Diagramm 11: Genexpression von TNF- α	72
Diagramm 12: Genexpression von MCP-1	74
Diagramm 13: Genexpression von RANTES	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardisiertes Klassifikationsmodell der Abstoßung der Endomyokardbiopsie	10
Tabelle 2: Chemokin Rezeptoren	19
Tabelle 3: Primäre Antikörper	32
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper	33
Tabelle 5: Verbindungsantikörper	33
Tabelle 6: Mastermix für die Reverse Transkription	36
Tabelle 7: PCR-Mastermix für den internen Standard	39
Tabelle 8: PCR-Mastermix für alle Primer	39
Tabelle 9: Primersequenzen	40
Tabelle 10: Palpationsscore	42

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zellen
bp	Basenpaare
C	Cystein-Aminosäurerest
C3	Komplementfaktor 3
CD	Cluster of Differentiation
CD4	CD4 positive T-Zelle
CD8	CD8 positive T-Zelle
cDNA	Zyklische Desoxyribonukleinsäure (cyclic Desoxyribonuclein Acid)
CDR	complimentarity determing regions
CMV	Cytomegalie Virus
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonuclein Acid)
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP,dTTP)
ED-1	ED-1 positive Monozyten/Makrophagen
ELAM-1	Endotheliales leukozytäres Adhäsionsmolekül-1
ELISA	Enzyme-Linked Immunsorbent Assay
EMB	Endomyokardbiopsie
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GvHD	Graft-versus-host-disease
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HLA	Human Leukocyte Antigens
ICAM-1	Intercelluläres Adhäsionsmolekül-1 (Intercellular Adhesion Molecule)
IFN- γ	Interferon- gamma
IL	Interleukin

IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
kD	Kilo Dalton
LEW	Lewis Ratten
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen-1
LPS	Liposaccharide
MCP-1	Monozyten Chemotaktisches Protein-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Nitric Oxide
O.D.	optische Dichte
PBGD	Porphobilinogen deaminase
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PET	Positronen Emissions Tomographie
R73	R73 positive T-Zellen
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted
RNA	Ribonucleinsäure (Ribonuclein Acid)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SEM	Standard error of mean
SD	Standard deviation of the mean (Standardabweichung)
Tac	T-Zell-Aktivierungs-Antigen

TCR	T Zell Rezeptor
Th	T-Helferzellen
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TVP	Transplantatvaskulopathie
VCAM-1	Vasculäres Adhäsionsmolekül-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule)
VLA-4	Very Late Activation Molecule-4
VWF	von Willebrand Faktor
WF	Wistar Furth Ratten

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Transplantation

Schon in der Antike tauchte der Wunsch auf, kranke Körperteile durch Gesunde zu ersetzen. In dem Gemälde eines unbekannten Meisters (Anfang des 16. Jahrhunderts) wird erstmals die Organtransplantation bildlich dargestellt. Der Legende nach soll ca. im Jahre 348 n. Chr. ein gläubiger Mann im Schlaf von zwei Heiligen das Bein eines Mooren verpflanzt bekommen haben.

Grundvoraussetzungen für die Transplantation vaskularisierter Organe stellte die Entwicklung gefäßchirurgischer Techniken dar. Alex Carrel erarbeitete 1901 in Lyon, Frankreich eine Technik für Gefäßanastomosen [1]. Experimentell erfolgten danach zahlreiche Herztransplantationen an Hunden. Hierfür wurde er „Als Anerkennung seiner Arbeiten über die Gefäßnaht sowie über Gefäß- und Organtransplantation“ 1912 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Klinisch wurde die erste erfolgreiche solide Organtransplantation 1954 von Joseph Murray im Peter Bent Brigham Hospital in Boston, USA durchgeführt. Hierbei erfolgte die Übertragung einer Niere zwischen zwei eineiigen Zwillingen [2]. Murray erhielt dafür 1990 den Nobelpreis. 1962 führte Sir Roy Calne die erste erfolgreiche allogene Nierentransplantation unter der Verwendung von Immunsuppressiva durch.

Im Jahre 1963 erfolgte die erste Lebertransplantation durch *Starzl*, Denver, USA und im gleichen Jahr die erste Lungentransplantation durch *Hardy*, Mississippi, USA. Die erste Pankreastransplantation wurde 1966 von *Lillehei*, Minnesota, USA realisiert. Die erste Herztransplantation gelang *Barnard*, in Kapstadt, Südafrika 1967 beim Menschen, nach experimentellen Vorversuchen durch *Lower* und *Shumway*, Stanford, USA.

Die Entstehung der Transplantationsimmunologie als neue wissenschaftliche Disziplin resultierte aus den Erkenntnissen der experimentellen und klinischen Transplantation. Grundlage für weitere Untersuchungen bildete die Entdeckung der 3 unterschiedlichen Blutgruppen durch Landsteiner 1901 in Wien.

Dafür wurde er 1930 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet. Die zellulären Grundlagen der Transplantatabstoßung als immunologisches Phänomen wurden von dem britischen Biologen *Medawar* beschrieben. Er führte folgende Experimente durch: Hauttransplantate einer Maus des Stammes A wurden auf eine Maus B übertragen. Nach 10 Tagen erfolgte die Abstoßung dieser Haut durch eine nekrotisierende Entzündung. Dies bezeichnete er als „first set rejection“. Überträgt man demselben Tier B ein zweites Hauttransplantat von Tier A, so wird dieses schon nach 3 Tagen mit einer heftigeren Reaktion abgestoßen, im Gegensatz zu den 10 Tagen nach der ersten Hauttransplantation [3]. Durch die erste Hauttransplantation wurde eine Reaktion ausgelöst, an die sich der Organismus beim zweiten Mal erinnert, sodass die beim ersten Mal aktivierten Abwehrkräfte in kürzerer Zeit mobilisiert werden. Diesen Vorgang bezeichnete Medawar als „second set rejection“. Wurde nun dem Tier B Haut eines anderen Stammes C übertragen, so erfolgte die Abstoßungsreaktion wieder nach 10 Tagen. Aus seinen Versuchen schloss Medawar, dass die immunologische Sensibilisierung spenderspezifisch ist. Medawar erhielt 1960 den Nobelpreis „Für die Entdeckung der immunologischen Toleranz“ [4].

Der Franzose *Dausset* entdeckte 1953 erstmals ein Histokompatibilitätsantigen (HLA) an der Oberfläche weißer Blutkörperchen. Dies bedeutete einen Meilenstein in der Erforschung der Regulation des Immunsystems [5]. Seine Untersuchungen bildeten die Grundlage für die erste Gewebstypisierung zwischen Spender und Empfänger, die von *Hamburger* in Paris, Frankreich 1962 eingeführt wurde.

1.2 Entwicklung der klinischen Herztransplantation

Bei terminaler Herzinsuffizienz stellt die Herztransplantation eine etablierte Behandlungsoption mit exzellentem funktionellem Ergebnis und guter Langzeitprognose dar.

Die Hauptindikation für die Herztransplantation ist die terminale Herzinsuffizienz auf dem Boden einer dilatativen Kardiomyopathie oder ischämischen Kardiomyopathie.

Weltweit wurden zwischen 1967 und 2004 über 66000 Herztransplantationen durchgeführt [6]. Nach der ersten erfolgreichen Herztransplantation 1967 durch *Barnard* gab es in den folgenden Monaten über 100 Transplantationen weltweit, mit jedoch unbefriedigenden kurz- und mittelfristigen Ergebnissen, sodass fast alle Transplantationsprogramme weltweit eingestellt wurden. In den siebziger Jahren erfolgte fast ausschließlich in Stanford, USA die systematische Erforschung der Herztransplantation als experimentelle und klinische Therapieform. Aufgrund der verbesserten klinischen Ergebnisse wurden seit Beginn der 80er Jahre Herztransplantationen an einer zunehmenden Anzahl von Zentren weltweit durchgeführt.

Verbesserungen in der Immunsuppression und der technische Fortschritt haben zu einem Ein-Jahres-Überleben der transplantierten Organe in über 80% der Fälle geführt [7]. Insgesamt trugen die Fortschritte zu einer Verbesserung der Transplantatfunktion in der frühen Phase bei. Im Langzeitverlauf stellt die Ausbildung der Transplantatvaskulopathie, auch chronische Abstoßung genannt, ein großes Problem dar. Darüber hinaus besteht eine erhöhte Inzidenz zu malignen Erkrankungen.

Akute Abstoßungsepisoden treten bei der Mehrzahl der Patienten nach einer erfolgten Herztransplantation auf. Im Mittel erleidet jeder Patient 1,3 Abstoßungsepisoden im ersten Jahr der Herztransplantation [8-10]. Im weiteren Verlauf treten akute Abstoßungsepisoden eher selten auf. Sie sind jedoch für ca. 30% aller Todesfälle im Langzeitverlauf nach Herztransplantationen verantwortlich. Akute Abstoßungsepisoden sind prädisponierend für die Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion und haben daher ein schlechtes Langzeitergebnis nach solider Organtransplantation zur Folge [11-14].

1.3 Begriffsdefinition der Transplantation

Unter Transplantation versteht man die Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen (den Transplantaten) von einem Spender (Donor) auf einen Empfänger (Rezipienten).

Bei der sogenannten Autotransplantation sind Spender und Empfänger identisch (z.B. Hauttransplantation). Syngene Transplantationen bezeichnen Transplantationen zwischen genetisch identischen Individuen (eineiige Zwillinge). Allogentischen Transplantationen sind Transplantationen zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen einer Spezies. Dies ist die häufigste Form der Organtransplantation. Xenotransplantationen sind Transplantationen zwischen verschiedenen Spezies, z.B. Verpflanzung eines Tierherzens in einen Menschen.

Bei einer orthotopen Transplantation werden die Spenderorgane in ihre ursprüngliche anatomische Lage verpflanzt (z.B. Herz). Bei einer heterotopen Transplantation wird das Organ nicht in seine ursprüngliche anatomische Lage verpflanzt.

1.4 Grundlagen der Transplantationsimmunologie

Fast 40 Jahre sind seit der ersten Herztransplantation vergangen. Seitdem hat sich die Ein-Jahres-Überlebensrate von 20% im Jahre 1968 bis heute auf 80% gesteigert. Wobei die Langzeitüberlebensrate bei 60% nach 5 Jahren und 40% nach 10 Jahren liegt [7].

Transplantierte Organe stellen fremdes Antigen dar (nicht Selbst) und induzieren eine Immunantwort. Das stärkste Signal der Fremderkennung bildet das MHC-Molekül (major histocompatibility complex), beim Menschen auch HLA (human leucocyte antigen) genannt. Individuen einer Spezies unterscheiden sich im wesentlichen durch die HLA Oberflächenproteine. Die Immunreaktionen werden durch T- und B-Lymphozyten vermittelt. T-Lymphozyten spielen die zentrale Rolle innerhalb der Immunantwort. Wenn sie einmal durch ein Antigen aktiviert wurden, koordinieren sie die Einbeziehung, Differenzierung und Aktivierung vieler weiterer Zellen.

T-Lymphozyten sind primär verantwortlich für die zellvermittelte Immunität, die auch die Hauptrolle bei der akuten Abstoßung spielt. B-Lymphozyten sind dagegen für die humorale, antikörperabhängige Immunantwort verantwortlich, die sowohl bei der akuten als auch der chronischen Abstoßung beteiligt ist. T-Lymphozyten regulieren wiederum die Aktivität der B-Lymphozyten. Zusätzlich zur Antigen-spezifischen Immunantwort tragen weitere Zellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen über entzündliche Prozesse zur Transplantatabstoßung bei.

Immunantworten, die durch T-Lymphozyten vermittelt werden, erfordern die Umwandlung der T-Lymphozyten aus einem Ruhestadium in einen aktivierten Zustand. Die Aktivierung erfordert 2 Signale [15]. Am Anfang stehen die geeignete Prozessierung, Präsentation und Interaktion des Antigens mit seinem spezifischen T-Zell-Rezeptor. Anschließend erfolgen die Expression von Interleukin-2 (IL-2) und dem hoch-affinen IL-2 Rezeptor (IL-2R) durch den T-Lymphozyten. Wenn T-Lymphozyten einmal aktiviert sind, bestimmen sie unter Verwendung von Zytokinen die endgültige Differenzierung und Proliferation einer Vielzahl von Blutzellen wie der B-Lymphozyten, der zytotoxischen T-Lymphozyten, der NK-Zellen und Makrophagen. Solche Zellen besitzen Effektor-Funktion und führen zur Gewebeerstörung des Transplantats.

Zur Antigen-Präsentation kommt es einmal über den *direkten Weg*, wenn die Antigen-Präsentation durch gewebständige Antigen präsentierenden Zellen (APC) des Spenders übertragen werden und somit MHC-Moleküle des Spenders exprimieren. Oder auf dem *indirekten Weg*, wenn Peptidfragmente von Spenderantigenen mit eigenen Proteinen des MHC-Komplexes (Klasse I oder II) auf der Zelloberfläche von Empfänger Antigen-präsentierenden Zellen dargestellt werden [16].

Die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen sind die dendritischen Zellen. Das präsentierte Peptid wird daraufhin von einem Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt. Der Rezeptor besteht aus zwei Ketten (α und β) und ist wiederum mit mehreren verschiedenen Ketten des CD3-Komplexes verbunden. Die Antigenspezifität des T-Zell-Rezeptors beruht auf sogenannten Komplementärregionen (complementarity determining regions, CDRs), die sich in der variablen Region oder der N-terminalen

Domäne jeder Rezeptorkette befinden. Der CD3-Komplex hat Transduktionsaufgaben und vermittelt die Aktivierung der T-Lymphozyten ins Zellinnere.

An der Interaktion zwischen Antigen-präsentierender Zelle und T-Lymphozyt sind weitere Moleküle beteiligt. Dazu gehören Adhäsionsmoleküle sowie zusätzliche Moleküle mit Transduktionsaufgaben (CD4 auf Helferzellen, CD8 auf zytotoxischen und Suppressor-Zellen). Die Moleküle wirken als Co-Stimulatoren, oder sie vermitteln Zweitsignale [17].

T-Lymphozyten empfangen neben den Signalen durch den TCR weitere Signale durch eine Vielzahl von Zytokinen, die an spezifische Oberflächenrezeptoren binden. Diese Zytokine vermitteln eine abgestimmte Reaktion von entzündlichen und immunologischen Prozessen. Zytokine regulieren sowohl die Stärke als auch die Natur der Immunantwort, indem sie die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten zu Th1 oder Th2-Zellen induzieren und fördern. Diese Subpopulationen sezernieren unterschiedliche Zytokinmuster. Th1 Lymphozyten vermitteln verstärkt eine zellabhängige Immunität, während Th2 Lymphozyten eine Antikörper-abhängige Immunantwort fördern.

Zunächst erkennt der spezifische T-Zell-Rezeptor (TCR) das fremde Antigen in Form eines prozessierten Peptids (Antigen = Ag-Peptid). Das Antigen befindet sich in der Kaverne eines MHC-Moleküls der APC. Daran anschließend nehmen eine Anzahl verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der T-Zelle Kontakt zu ihren Liganden auf der APC auf. Dazu gehören auch die CD4 und CD8 Moleküle, die Co-Rezeptoren der MHC-Moleküle darstellen sowie CD28, das mit dem Liganden B7 auf der APC in Kontakt tritt. Dies führt zur Co-Stimulation.

Abschließend exprimiert die T-Zelle Rezeptoren für verschiedene Faktoren, die Größe und Differenzierung bestimmen. Zu diesen Faktoren gehört Interleukin-2. Einige der Faktoren werden von anderen aktivierten T-Zellen produziert. Sie bilden die Basis für „Hilfe“ und Zusammenarbeit zwischen den Zellen. Die Bindung an den T-Zell-Rezeptor markiert das erste Signal für die T-Zell-Aktivierung. Das Endergebnis, entweder eine proliferative Immunantwort oder ein nicht-aktivierter Status, hängt dagegen von weiteren Signalen ab, die von den Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren ausgehen.

Es werden verschiedene Abstoßungsreaktionen unterschieden:

- hyperakute Abstoßung
- akzelerierte Abstoßung
- akute Abstoßung
- chronische Abstoßung

Die *hyperakute Abstoßung* tritt innerhalb von wenigen Minuten auf und führt intraoperativ zum sofortigen Verlust des Transplantats. Sie tritt vor allem bei der Xenotransplantation auf oder bei höchstsensibilisierten Patienten. Hierbei kommt es zu einer Reaktion zwischen präformierten Antikörpern und dem Endothel mit einer anschließenden Aktivierung der Komplement-Kaskade. Dies führt zum Verlust der natürlichen Antikoagulationseigenschaft des Endothels. Daraus resultiert eine intravaskuläre Koagulation mit einer nachfolgenden ischämischen Nekrose [18, 19].

Die *akzelerierte Abstoßung* ist B- und T-Zell vermittelt und tritt nach Stunden bis Tagen auf. Sie beruht auf einer wiederholten Immunreaktion gegen spenderspezifische Antigene [20-22]. Risikofaktoren für eine Sensibilisierung stellen in erster Linie vorangegangene Bluttransfusionen, ein früheres Organtransplantat, Schwangerschaften oder vorangegangene akute Abstoßungsperioden dar. Histologisch werden endotheliale Ablagerungen von Immunglobulinen, C3, Fibrin sowie eine ausgeprägte Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen beobachtet.

Die *akute Abstoßung* ist in erster Linie T-Zell vermittelt. Innerhalb weniger Tage kommt es zu einer komplexen Immunantwort, induziert durch die Transplantation eines Organs oder eines Gewebes eines genetisch differenten Spenders. Es kommt zur Aktivierung von Adhäsionsmolekülen sowie zur Aktivierung verschiedener Zellpopulationen, die eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren exprimieren. Auch Antikörper scheinen Einfluss auf die akute Abstoßung zu nehmen [14]. Histologisch kommt es zu ausgeprägten zellulären Infiltrationen, vorrangig von T-Zellen und Makrophagen. Es lassen sich ödematöse und nekrotische Veränderungen nachweisen. Daraus resultiert eine vollständige Zerstörung des Transplantats.

Die *chronische Abstoßung* oder auch chronische Transplantatvaskulopathie genannt, ist ein langsam fortschreitender Prozess. Durch eine Vielzahl von immunologischen und nicht-immunologischen Einflussgrößen kommt es zu einer progredienten Destruktion luminärer Strukturen [23]. Im Langzeitverlauf stellt die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie klinisch ein erhebliches Problem dar. Hierbei kommt es zu einer konzentrischen neointimalen Proliferation, die diffus die gesamten Koronarien betrifft. Klinisch ist sie nach 5 Jahren in 50% aller Herztransplantierten nachgewiesen worden [24].

Die exakte Pathogenese der TVP ist unklar. Es ist von einer multifaktoriellen Genese auf dem Boden einer immunologisch “Response-to-Injury“ bedingten Gefäßerkrankung auszugehen. Aber auch nicht-immunologische Faktoren spielen eine wichtige Rolle. Das initiale Ereignis am Beginn der Erkrankung ist die Endothelverletzung [24]. Es kommt zu einer Vasokonstriktion, einer Thrombozytenaktivierung, einer Gefäßwandentzündung und schließlich zu Proliferation glatter Muskelzellen. Eine Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) konnte bei Patienten nach einer Herztransplantation nachgewiesen werden [25]. Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen ICAM-1 Expression und dem Auftreten einer angiographisch sichtbaren TVP [26]. Weiterhin kommt es durch die Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten zur Freisetzung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, die proliferierend auf die infiltrierenden Zellen wirken und eine Vermehrung der glatten Muskelzellen begünstigen [27].

Histologisch kommt es zu konzentrischen arteriosklerotischen Veränderungen, auch fokale Intima-Plaques im Sinne der typischen Ausprägung der Arteriosklerose sind zu finden. Als Folge sind sekundäre Myokardischämien oder –infarzierungen, Kardiomegalie, Herzinsuffizienz und ventrikuläre Arrhythmien mit der möglichen Folge eines plötzlichen Herztodes zu beobachten. Der pektangiose Schmerz fällt als klinisches Zeichen der Myokardischämie zumeist infolge der Denervierung des transplantierten Herzens aus [28, 29].

Zu den *immunologischen Faktoren* zählen eine MHC-Unverträglichkeit, eine insuffiziente Immunsuppression, vorherige Immunisierung, Bildung von leukozytären

Antikörpern über Blutkonserven, vorausgegangene Organtransplantationen oder Schwangerschaft, die letztlich alle in einer erhöhten Rate von akuten Abstoßungsprozessen resultieren.

Zu den möglichen Risikofaktoren zur Entstehung einer Transplantatvaskulopathie zählen aber auch *nichtimmunologische Faktoren*, wie der Ischämie/Reperfusionsschaden, eine Infektion mit dem Cytomegalie-Virus (CMV), ein hohes Alter des Spenders, Bluthochdruck, Rauchen sowie ein schlecht eingestellter Fettstoffwechsel und Hirntod.

1.5 Mechanismus der akuten Transplantatabstoßung

Die akute Transplantatabstoßung ist eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität nach Herztransplantation. Die akute Abstoßungsperiode erhöht auch bei erfolgreicher Therapie das spätere Risiko für die Entwicklung des chronischen Organfunktionsverlustes [11-14].

Die akute Transplantatabstoßung ist primär ein T-Zell vermittelter Prozess. Treten mehrfach akute Abstoßungsperioden auf, kommt es zur Ausbildung einer humoralen Immunität, die gegen Antigene des Spenders gerichtet ist. Im Rahmen der Antikörper-Antigen Erkennung spielt die Komplementaktivierung und daraus folgende Fibrinablagerung sowie Thrombenbildung in den kleinen Gefäßen eine Rolle. Daraus resultiert die Nekrotisierung des Gewebes mit Zerstörung des Organs.

Die zellvermittelte Immunreaktion ist für die Abstoßung transplanterter Organe von größerer Bedeutung als die humoralen Abwehrmechanismen. Es kommt zur Gewebszerstörung durch zytotoxische T-Zellen, mit massiver Freisetzung verschiedener Mediatoren und Einwanderung anderer immunkompetenter Zellen. Zirkulierende T-Lymphozyten des Empfängers erkennen fremde MHC-Moleküle der Klasse I und II auf dem Spenderendothel. Diese MHC-Moleküle bilden das stärkste Signal der Fremderkennung.

1.5.1 Klinische Charakterisierung der akuten Abstoßung

Den Goldstandard der Diagnostik von akuten Abstoßungsreaktionen stellt nach wie vor die histomorphologische Untersuchung von Endomyokardbiopsien dar [30, 31]. Die in Stanford 1973 [32] eingeführte Endomyokardbiopsie (EMB) erfolgt über ein durch die rechte Vena jugularis interna eingeführtes Biopptom. Die Entnahme der Biopsie erfolgt an der Herzspitze. Zur Beurteilung der histologischen Veränderungen haben sich im Laufe der Zeit weltweit verschiedene Klassifikationen entwickelt, welche Abstoßungsreaktionen entweder qualitativ oder quantitativ erfassen und sich in deren Graduierung unterscheiden. Als Grundlage für eine einheitliche Nomenklatur hat die International Society for Heart and Lung Transplantation 1990 die ISHLT-Klassifikation entwickelt, da man die Notwendigkeit erkannte, eine international vergleichbare Klassifikation zu schaffen [33].

Tabelle 1: Standardisiertes Klassifikationssystem der Abstoßung in der Endomyokardbiopsie (Billingham 1990) [33]

Grad	ISHLT
0	Keine Abstoßung
1	A= fokal (perivaskuläres oder intertistiell Infiltrat) B= spärliches diffuses Infiltrat
2	Ein Herd mit aggressiver Infiltration oder fokale Myozytenschädigung
3	A= multifokale aggressive Infiltrate B= diffuser entzündlicher Prozeß
4	Diffuse aggressive polymorphe Abstoßung ± Ödem ± Hämorrhagie ± Vaskulitis

1.6 Mediatoren der akuten Abstoßung

Folgende Mediatoren spielen im Rahmen der akuten Abstoßung eine Rolle:

- Adhäsionsmoleküle
- Zytokine/Interleukine
- Chemokine

1.6.1 Adhäsionsmoleküle

Die spezifische Adhäsion von Zellen untereinander oder deren Anheftung an die extrazelluläre Matrix ist eine grundlegende Voraussetzung für die Zellerkennung und Prozesse der Zellmigration. Zell / Zell-Interaktionen und die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix spielen neben wichtigen physiologischen Phänomenen aber auch eine Schlüsselrolle bei vielen pathologischen Veränderungen wie Tumormetastasierung, Organabstoßung und Transplantationen, Ischämie und Autoimmunkrankheiten [34].

Die Adhäsion von Leukozyten an das Epithel und die sich daran anschließende Wanderung durch die Gefäßwand im Rahmen eines entzündlichen Geschehens findet vor allem in den postkapillären Venolen statt [35]. Die sequentielle Kaskade molekularer Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Endothelzellen besteht aus:

- 1.) initialem Kontakt
- 2.) Rollen
- 3.) Haften
- 4.) transendotheliale Migration (Diapedese)
- 5.) Chemotaxis

Abbildung 1: Schema der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel. Modifiziert nach Carlos [34]

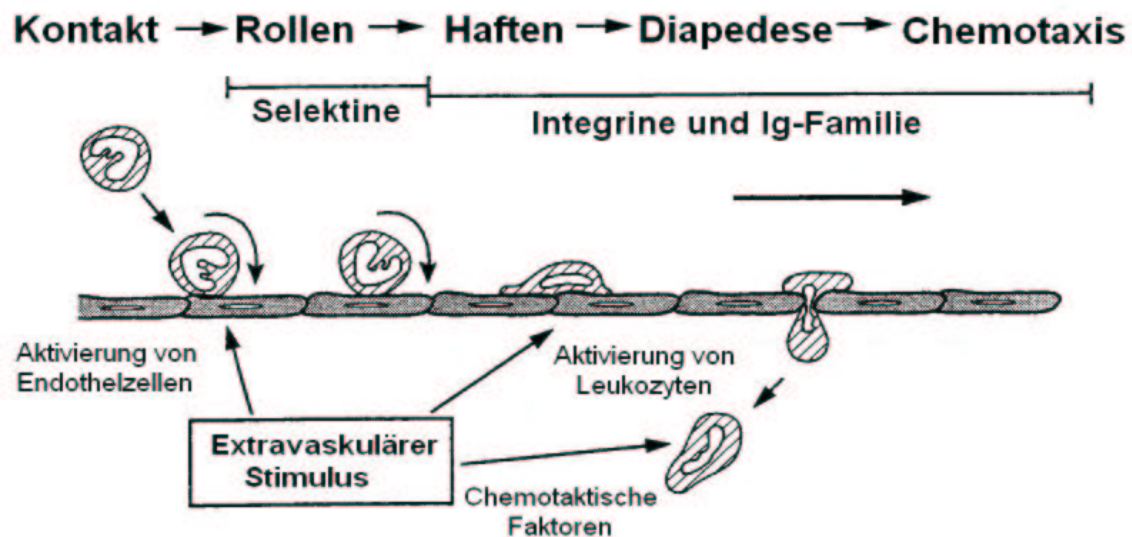


Abb.2 Leukozyten werden von Selektinen, die sich auf aktivierten Endothel befinden, aus dem Blutstrom gebunden und rollen an der Blutgefäßwand entlang. Sie binden dann über Integrine an das Endothel und werden „flach“, ein Zeichen der Aktivierung. Die Integrine haben die Immunglobulin-Superfamilie-Moleküle zum Liganden (=Bindungspartner). Die Leukozyten reagieren auf chemotaktische Signale und wandern durch das Endothel hindurch in das Gewebe ein.

Adhäsionsmoleküle sind chemisch betrachtet Proteine. Sie werden auf der Basis struktureller Homologien verschiedenen Molekül-Familien zugeordnet. Die an der Leukozyten-Migration beteiligten Moleküle gehören zu den Selektinen, den Integrinen und der Immunglobulin-Superfamilie.

Bisher sind drei Selektine bekannt: E-, P- und L-Selektin. Die Selektine spielen eine große Rolle in der frühen Phase der Leukozyten-Emigration (Auswanderung aus den Gefäßen). Sie vermitteln den ersten Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel. Sie führen zur Verlangsamung des Blutflusses und schließlich zu einem Phänomen, das als „*Rolling*“ beschrieben wird, dem „*Rollen*“ von Leukozyten entlang der inneren Wand der Blutgefäße (siehe Abbildung 1).

In der nächsten Phase werden Integrine auf den rollenden Leukozyten verstärkt exprimiert. Diese sind heterodimere Transmembranproteine bestehend aus einer nicht-kovalent gebundenen α - und β -Kette. Die verstärkte Expression von Integrinen erhöht die Bindungsaktivität der zirkulierenden Leukozyten.

Sie vermitteln die feste Anheftung von Leukozyten an das Endothel der Gefäße, was Voraussetzung für die Auswanderung der Leukozyten aus den Blutgefäßen ist.

Zu der dritten Gruppe der Adhäsionsmoleküle gehört die Immunglobulin-Superfamilie. Diese Familie wird so genannt, weil die einzelnen Mitglieder strukturell Ähnlichkeiten zu den Immunglobulinen aufweisen. Zu dieser Familie gehören *ICAM-1* (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1), *VCAM-1* (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) und *PECAM* (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule). Alle drei werden vom Gefäßendothel exprimiert und binden an Integrine auf der Zelloberfläche von Leukozyten [34]. Unter dem Einfluss lokal gebildeter Entzündungsfaktoren, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin-1 (IL-1) werden interzelluläre Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen zunehmend exprimiert [11].

Sie sind für die feste Adhäsion der aktivierten Leukozyten an das Endothel verantwortlich. Nach der festen Adhäsion an das Endothel wandern Leukozyten entlang eines Gradienten chemotaktischer Faktoren (Fragmente des Komplementsystems, Chemokine u.a.) in das Gewebe ein (Diapedese), wo sie lokal ihre Effektorfunktionen, wie Antigenerkennung oder Einleitung von Entzündungsreaktionen, ausführen können.

Das Zusammenspiel von *ICAM-1* und *VCAM-1* ist in der Vergangenheit als eines der wichtigsten Ereignisse bei der Bindung von Leukozyten an Endothelzellen beschrieben worden [35-37].

ICAM-1 (CD54) wird auf Fibroblasten, Leukozyten, Endothel-, Epithel- und vielen Tumorzellen exprimiert [38]. Als Ligand für ICAM-1 ist das Integrin LFA-1 (*lymphocyte-function-associated-antigen-1*) auf Lymphozyten bekannt (siehe Abbildung 2).

VCAM-1 (CD106) kommt auf endothelialen, epithelialen, dendritischen Zellen und Makrophagen vor [39]. Das Transmembranprotein ist ursprünglich als ein induzierbares Molekül auf humanen Endothelzellen entdeckt worden, das in der Lage ist, sowohl Lymph- als auch Tumorzelllinien zu binden [40].

(siehe Abbildung 2). Die endotheliale VCAM-1 Expression kann durch die Zytokine IL-1 α bzw. -1 β , TNF- α und IL-4 induziert werden [41].

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Adhäsion von einer T-Zelle mit dem Endothel.

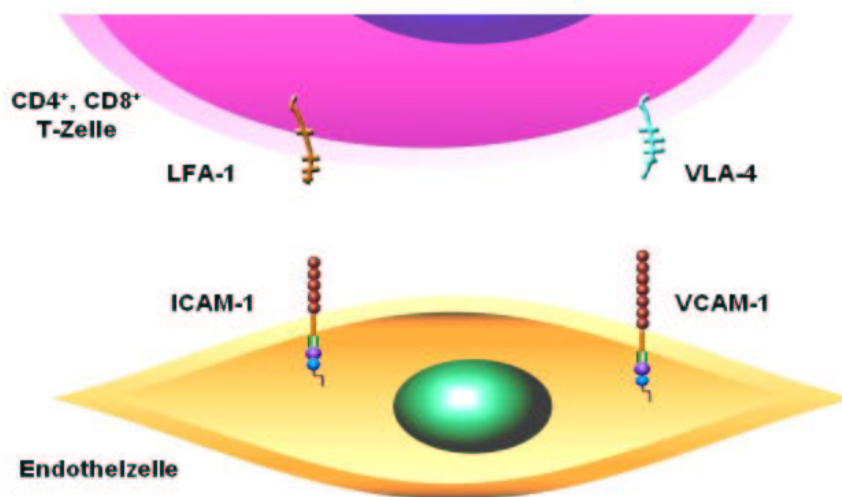


Abb.2: Als Ligand für ICAM-1 ist das Integrin LFA-1 auf Lymphozyten bekannt. Die Adhäsion von VCAM-1 wird durch die Bindung des Liganden VLA-4 auf Lymphozyten vermittelt.

1.6.2 Interleukine

Interleukine werden von Leukozyten gebildet und gehören zu der Gruppe der Zytokine. Interleukine sind lösliche Polypeptide, die parakrine und autokrine Funktionen erfüllen. Sie regulieren eine Vielzahl von immunologischen Prozessen. Seit der Entdeckung des T-Zell Wachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2), im Jahre 1978, wurde das Interesse an Interleukinen geweckt [42]. Die biologische Aktivität der Interleukine wird durch spezifische Membranrezeptoren vermittelt, die auf einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen exprimiert werden. In der Transplantationsimmunologie spielen Interleukine eine bedeutende Rolle. Im Jahre 1991 zeigte Romagnani, dass humane T-Helferzellen (CD4-Zellen) verschiedene Zytokinmuster exprimieren, so entstand das Th1/Th2 Paradigma [43, 44]. Th1-Zellen exprimieren IL-2, IFN- γ und TNF- β und sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich, während die von Th2-Zellen exprimierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 für die Toleranzinduktion, B-Zell Differenzierung und Antikörper-Produktion verantwortlich gemacht werden [45, 46].

1.6.2.1 Interleukin-2 (IL-2)

Interleukin-2 (IL-2) ist eines der wichtigsten Zytokine, das von T-Helfer Lymphozyten (CD4-Zellen) produziert wird. Die Synthese beginnt nach der Bindung des spezifischen Antigens an den T-Zell Rezeptoren. Das IL-2-Gen wird nach Aktivierung binnen 30 Minuten transkribiert [47]. Die Freisetzung erfolgt innerhalb von 8 bis 12 Stunden nach der Aktivierung der T-Zellen in Zellkulturen [48].

IL-2 kann die Zelle, die es freisetzt, stimulieren (autokrin) oder Zellen in direkter Umgebung aktivieren (parakrin). IL-2 reagiert mit verschiedenen Rezeptoren auf aktivierten B- und T-Lymphozyten. Zunächst führt das IL-2 Signal zur Proliferation der Zielzelle, im weiteren Verlauf ermöglicht es die Effektorfunktion der jeweiligen Zielzelle.

IL-2 wirkt als vielseitiger Mediator innerhalb des Immunsystems. Zu den verschiedenen Zielzellen zählen alle T-Lymphozyten-Unterklassen, aber auch B-Lymphozyten, NK-Zellen (Natürliche Killerzellen), Makrophagen und viele mehr. Darüber hinaus induziert IL-2 eine Zytokinkaskade, in der verschiedene andere Interleukine (u.a. IL-1 α und β), Interferone (IFN) und die Tumornekrosefaktoren α und β (TNF- α und β), involviert sind [49].

1.6.2.2 Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R)

Der hoch empfindliche IL-2-Rezeptor befindet sich nur auf aktivierten Lymphozyten. Er besteht aus drei Proteinuntereinheiten:

- IL-2R α , ein 55 kD-Peptid, auch als CD25 oder T-Zell-Aktivierungs-Antigen (Tac) bekannt. IL-2R α kommt nur im IL-2 Rezeptor vor.
- IL-2R β , ein 75 kD-Peptid
- IL-2R γ , ein 64 kD-Peptid. Es erleichtert die Bindung von IL-2 an das β -Peptid und führt zur Signaltransduktion.

Neben den drei Proteinketten sind weitere Proteine mit dem IL-2-Rezeptor assoziiert. Dazu gehören u.a. MHC-I-Moleküle, ICAM-1 und Tyrosin-Kinasen. Die meisten ruhenden T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen exprimieren einen mäßig empfindlichen IL-2-Rezeptorkomplex mit den Bestandteilen der β - und γ -Kette, jedoch nicht der α -Untereinheit (Tac). Tac wird ausschließlich produziert, wenn die Zelle durch ein fremdes Antigen oder IL-2 aktiviert wird. Nur stimulierte T-Lymphozyten besitzen also den hoch empfindlichen IL-2-Rezeptor. Isoliert besitzt die α -Kette nur eine geringe Affinität für IL-2, ferner hat sie keine Signaltransduktionsmechanismen. Zellen, die den mäßig empfindlichen IL-2-Rezeptor tragen, binden IL-2 mit mäßiger Empfindlichkeit. Wenn T-Zellen durch ein Antigen aktiviert werden, erfolgt die Expression von IL-2 und Tac. Tac ist die einzige Untereinheit der 3 Ketten, die ausschließlich im IL-2-Rezeptor exprimiert wird. Die β - und γ -Ketten sind dagegen auch an anderen Rezeptoren beteiligt. Nach Stimulation wird die α -Kette rasch synthetisiert, sie assoziiert dann mit den anderen beiden Ketten in der Zellmembran. Gemeinsam bilden alle 3 Komponenten

den hoch empfindlichen IL-2-Rezeptor. Die α - und β -Ketten können IL-2 unabhängig voneinander binden. Die γ -Kette ist für die Signaltransduktion verantwortlich. Die Bindungsstärke des Rezeptorkomplexes ist wesentlich höher als die Bindungsstärken der einzelnen Ketten. Die Interaktion von IL-2 mit seinem hoch-empfindlichen Rezeptor fördert die Proliferation und Differenzierung eines T-Lymphozyten. Dies führt zu einem raschen Anstieg verschiedener T-Lymphozyten mit Helfer-, Suppressor- und zytotoxischer Aktivität. Zusätzlich wird verstärkt IL-2 produziert und sezerniert, so dass sich das System selbst stimuliert. Normale ruhende T-Lymphozyten exprimieren Tac nicht [50-52].

1.6.2.3 Interleukin-1 (IL-1)

Zunächst als Kostimulus für T-Zellen beschrieben, wurde Interleukin-1 (IL-1) als zentraler Mediator bei der Auslösung und Modulation von Entzündungs- und anderen Immunreaktionen etabliert.

Es sind zwei Formen von IL-1 bekannt, IL-1 α und IL-1 β . Die beiden Formen weisen weniger als 30% Homologien untereinander auf, binden aber beide an den gleichen Zell-Oberflächen-Rezeptor und verfügen über die gleiche biologische Wirksamkeit.

Lokale Wirkungen von IL-1 zielen auf die Rekrutierung und Aktivierung von immunkompetenten Zellen. Neben direkten chemotaktischen Wirkungen induziert IL-1 Chemokine. Es wirkt auf Endothelzellen, dort steigert es die Expression von Adhäsionsmolekülen und ermöglicht so die Anheftung von Leukozyten. IL-1 stimuliert die Freisetzung von Proteasen, Kollagenasen und Hyaluronidasen und fördert dadurch die Gefäß- und Gewebepermeabilität und damit die Infiltration der Leukozyten [50].

Viele biologische Wirkungen von IL-1 beruhen auf der verstärkten Synthese und Freisetzung von Zytokinen und potenten, proinflammatorischen Mediatoren, wie Leukotrienen, Prostaglandinen und NO. IL-1 unterstützt Wachstum und Aktivierung von T-Zellen, unter anderem durch Induktion von IL-2 und des IL-2 Rezeptors [53]. B-Zellen werden zu verstärkter Antikörperproduktion veranlasst.

1.6.2.4 Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)

Der Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) wird von aktivierten Monozyten und Antigen-stimulierten T-Zellen ausgeschüttet und ist als initialer Mediator bei allen Reparaturvorgängen und Keimabwehrprozessen beteiligt. Die Physiologische Funktion von TNF- α besteht in der Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten zum Ort der Entzündung. Am Endothel fördert TNF- α die Adhärenz von Granulozyten und damit die Diapedese von Leukozyten von der Blutbahn in das Gewebe. IL-1 β fördert gemeinsam mit TNF- α die Exprimierung von Adhäsionsmolekülen auf Zelloberflächen.

1.6.3 Chemokine

Bei den *chemotaktischen Zytokinen*, den Chemokinen, handelt es sich um Polypeptide der Größe zwischen 8-12 kD, die von verschiedenen Zellen des Immunsystems und beispielsweise auch von Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert werden können. Sie tragen zur chemotaktischen Rekrutierung sowie Aktivierung von Phagozyten und T- und B-Zellen bei. Chemokine spielen auch eine große Rolle in der angeborenen Immunabwehr, da sie durch die Rekrutierung und Aktivierung der Effektorzellen an der Einleitung und Erhaltung einer inflammatorischen Antwort wesentlich mitwirken. Ihre Effekte werden in einer parakrinen bzw. autokrinen Art und Weise vermittelt. Die Signaltransduktion erfolgt über ein heptahelicales G-Protein, wie typischerweise für die Leukozytenaktivierung/-adhäsion [51].

Chemokine werden aufgrund ihrer biochemischen Struktur, d.h. der Position der ersten beiden Cystein-Aminosäurereste (C) im aminoterminalen Teil des Peptids in die vier Unterfamilien C, CC, CXC (auch noch alpha- und beta-Chemokine genannt) und CXXXXC eingeteilt (X symbolisiert die Lage anderer Aminosäuren).

Die Chemokinrezeptoren werden entsprechend der Struktur ihrer Hauptliganden mit CCR, CXCR usw. bezeichnet [54].

Derzeit sind 11 Rezeptoren für CC-Chemokine (CCR1-11), 5 für CXC-Chemokine (CXCR1-5), einer für das CX3C-Chemokin (CX3CR1) sowie ein C-Chemokinrezeptor (XCR1) bekannt. Diesen 18 Chemokinrezeptoren stehen ca. 50 Chemokine gegenüber, entsprechend der Bindungsfähigkeit eines einzelnen Rezeptors für mehrere verschiedene Liganden [55].

Die CC Chemokine wirken chemotaktisch auf verschiedene Leukozyten-Populationen, wie Monozyten, eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen und dendritische Zellen. Repräsentative CC-Chemokine sind RANTES und MCP-1.

Tabelle 2: Chemokin Rezeptoren, ihre Liganden mit ihrer Leukozyten-Spezifität modifiziert nach Murphy [55]

Rezeptor	Ligand	Ursprung
CCR1	RANTES, MCP-1	Monozyten/Makrophagen, aktivierte T-Zellen, polymorphkernige Neutrophile, Basophile
CCR2	MCP-1	Monozyten/Makrophagen, aktivierte T-Zellen, Basophile
CCR3	RANTES	Eosinophile, aktivierte T-Zellen, Basophile
CCR4	RANTES, MCP-1	Aktivierte T-Zellen, Basophile
CCR5	RANTES	Monozyten/Makrophagen, aktivierte T-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen
CCR11	MCP-1	Unterschiedliche Organe

Neuere Befunde unterstreichen die Bedeutung der Chemokine sowohl für die physiologischen als auch die pathophysiologischen Vorgänge im Organismus. Beispielsweise wurde das CC-Chemokin MCP-1 ursprünglich als chemotaktischer Faktor beschrieben, der zusätzlich auch die Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und die Proliferation von mononukleären Zellen modulieren kann. In jüngster Zeit jedoch erkannte man zunehmend weitere Funktionen der Chemokine und ihre Rolle bei der Pathogenese von Erkrankungen mit einer (chronischen) inflammatorischen Komponente.

1.6.3.1 Monocyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)

Anfang der 1980er Jahre wurde ein murines JE-Gen beschrieben, das durch den „Platelet Derived Growth Factor“ (PDGF) in einer murinen Fibroblastenlinie induziert wird [56]. Die Klonierung und Expression des JE-Gens führte zu Spekulationen, dass es sich um ein Zytokin handle. Jedoch konnte diese Hypothese experimentell nicht bestätigt werden, bis man das homologe Gen (-Produkt) des Menschen gefunden hatte [55].

Das Chemokin MCP-1 zählt zu den CC-Chemokinen, weil es zwei unmittelbar aufeinanderfolgende Cysteinreste im aminoterminalen Bereich der Peptidsequenz besitzt. Die MCP Familie enthält MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 und MCP-5, aber nur MCP-1 scheint für die Transplantation entscheidend zu sein.

MCP-1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten, CD4+ und CD8+-Zellen. Es bindet nicht, bzw. hat keinen Effekt auf neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten oder B-Zellen. Der biologische Effekt auf NK-Zellen wird noch diskutiert. Außer seiner chemotaktischen Komponente induziert MCP-1 die Integrin Expression auf Monozyten, die Histamin Ausschüttung von basophilen Granulozyten und die Granulat Ausschüttung von NK-Zellen und CD8+ T-Zellen. MCP-1 hat seinen potentesten biologischen Effekt auf Monozyten [57].

Die Relevanz von MCP-1 in der Transplantation zeichnet sich dadurch aus, dass immunkompetente Zellen das Transplantat infiltrieren und es so zu seiner Zerstörung führen.

1.6.3.2 RANTES

RANTES (**R**egulated upon **A**ctivation, **N**ormal **T**-cell **E**xpressed and **S**ecreted) wurde zuerst von Schall et al. (1988) [58] beschrieben und schien nur von T-Zellen exprimiert zu werden. Jüngere Studien zeigen jedoch, dass RANTES auch von Monozyten/Makrophagen und eosinophilen Granulozyten exprimiert wird.

Die Bezeichnung RANTES wurde als Akronym benutzt, um die verschiedenen beobachteten und angenommenen Aktivitäten von RANTES zu charakterisieren:

Aus dem Englischen: **r**egulated upon **a**ctivation, **n**ormal **T**-cell **e**xpressed and **s**ecreted.

RANTES wird in die β -Superfamilie der CC-Chemokine eingeteilt.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass RANTES eine wichtige Rolle bei Entzündungen und Organabstoßungsprozessen spielt. Die Expression von RANTES wurde bei der Hauttransplantation an der Maus [59], in der Ratte nach Herztransplantation [60] und bei der Ratte nach Nierentransplantation beobachtet [61].

RANTES wird im entzündeten Gewebe exprimiert, nicht jedoch im gesunden Gewebe. Es wirkt hauptsächlich chemotaktisch auf Monozyten und gilt als das potenteste Chemokin in der CD8⁺-Zellen (Zytotoxische T-Zellen) Rekrutierung. RANTES stimuliert außerdem die Histamin Ausschüttung von basophilen Granulozyten, als auch die Migration von Monozyten aus der Blutbahn in das entzündliche Gewebe [57].

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, in einem klinisch relevanten, vollständig allogenen Herztransplantationsmodell, an der Ratte auf molekularer Ebene die Genexpressionsprofile im zeitlichen Verlauf der Reaktionskaskade, die die akute Abstoßung orchestriert, zu bestimmen. Das Fernziel bestand darin, über die rein histomorphologische deskriptive Klassifikation der ISHLT Abstoßungskriterien hinaus, die akute Transplantatabstoßung zu charakterisieren. Dazu wurden im zeitlichen Verlauf auf molekularbiologischer Ebene Genexpressionsprofile erstellt. Hierbei erfolgten in der Initial-, Früh- und Spätphase der akuten Abstoßung in diesem in-vivo-Model Organentnahmen. Die Organe wurden histologisch, immunhistochemisch und mit molekularbiologischen Methoden untersucht.

Spezifische Fragestellungen:

1. Ermittlung des Transplantatüberlebens im akuten Rattenherz-Transplantationsmodell.
2. Zu welchen histologischen Veränderungen kommt es im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung in den Transplantaten?
3. Wie ist die Expressionskinetik der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf immunhistochemischer und molekularbiologischer Ebene in der Frühphase der akuten Abstoßung?
4. Wie verhält sich die zelluläre Infiltration mit Monozyten und Makrophagen sowie T-Zellen während des zeitlichen Verlaufes der akuten Abstoßung?
5. Welche Expressionskinetik auf transkriptioneller Ebene ergibt sich bei IL-2, IL-2 Rezeptor, IL-1 α , IL-1 β , und TNF- α auf mRNA Ebene im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung?

6. Welche Expressionskinetik auf transkriptioneller Ebene ergibt sich bei den Chemokinen MCP-1 und RANTES auf mRNA-Ebene im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung?

2 Material und Methode

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Herkunft der Tiere

Die in der Studie verwendeten Tiere wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Alle Tiere waren in Bezug auf die wichtigsten, in Frage kommenden Infektionskrankheiten untersucht und als gesund attestiert worden. Dies wurde durch ein Gesundheitszeugnis des Tierlabors bestätigt.

Als Empfängertiere wurden männliche Lewis (LEW, RT-1¹) Inzuchtratten ausgewählt und die Spenderherzen von männlichen Wistar-Furth (WF, RT-1^u) Inzuchtratten entnommen. Die Durchführung der Transplantationen erfolgten, sobald die Spendertiere (WF) ein durchschnittliches Gewicht von ca. 250g und die Empfängertiere (LEW) ca. 300g erreicht hatten.

Für die Tierversuche lag eine „Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“ unter dem Aktenzeichen GI 20/10 – Nr. 38/2002 vor.

2.1.2 Tierhaltung

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Ratten in Gruppen von höchstens 2 Tieren in Käfigboxen in einem klimatisierten Tierstall mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Während des gesamten Versuchszeitraumes, auch unmittelbar prä- und postoperativ, erfolgte die Ernährung mit Wasser aus Trinkflaschen und pelletierter Fertignahrung (Altramin, Labortierservice, Lage-Lippe), die jedem Tier jederzeit frei zugänglich war.

2.2 Tiermodell

Herztransplantation

2.2.1 Narkose

Nach einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene®), erfolgte zielgerichtet die intramuskuläre Injektion von Ketamin (Ketanest®, 10 mg/100 g KG i.m.) in Kombination mit Xylazinhydrochlorid (Rompun®TS, 1.0 mg/100 g KG i.m.).

Diese Kombination, Narkoseinduktion für Kurznarkosen über ein inhalatives Narkotikum und längerandauernde Narkosen durch die Kombination von Ketamin und Xylazin, bieten den Vorteil der bedarfsangepassten Narkoseführung. Bei den Kurznarkosen mit Isofluran (Forene®) tritt die Wirkung nach Minuten ein. Dies ist mit der geringst möglichen Belastung für das Versuchstier verbunden. Für die längerandauernden operativen Eingriffe wurde die Kombination von Ketamin und Xylazin gewählt, da diese Narkotika gut dosierbar sind und geringe Kreislaufnebenwirkungen haben.

2.2.2 Operationsvorbereitung

Die narkotisierten Tiere wurden im Bereich des Thorax und Abdomens rasiert und in Rückenlage fixiert. Auf eine intraoperative Antibiotikaphylaxe wurde verzichtet. Während der gesamten Studie wurden keine Infektionen beobachtet.

2.2.3 Operatives Vorgehen

2.2.3.1 Vorbereitung des Empfängertieres

Nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe mit vollständiger Analgesie erfolgte die mediane Laparatomie. Das Darmkonvolut wurde in mit Kochsalz getränkten Kompressen nach extraabdominal mobilisiert.

Die großen Bauchgefäße, Aorta abdominalis und V. cava inferior wurden dargestellt und mit Haltefäden, Ethicon-Perma-Handseide® (schwarz, geflochten, 0,5 metric, 7-0) umschlungen.

Danach erfolgte die Längs- und Querinzision der Aorta abdominalis. Dies führte zu einer rautenförmigen Öffnung.

Die für die Anastomose verwendeten Nadel-Faden-Kombinationen, Prolene® (Ethicon, 0,5 metric, 7-0) wurden mit dem ersten Stich am proximalen und distalen Ende der rautenförmigen Öffnung befestigt, um so die Positionierung des Transplantates zu erleichtern. Danach erfolgte die Längsinzision der Vena cava inferior.

2.2.3.2 Entnahme des Transplantats

Parallel wurde das Spendertier betäubt (Isofluran, per Inhalationem) und das Herz entnommen. Hierbei wurden nach medialer Laparatomie und anschließender Durchtrennung des Zwerchfells sämtliche Rippen möglichst dorsal durchtrennt und das Herz freigelegt. Alle Gefäße des Herzens wurden bis auf den Truncus Pulmonalis und die Aorta descendens mit Perma-Handseide® (schwarz, geflochten, 0,5 metric, 7-0) legiert. Die großen Gefäße, über die später das Transplantat mit dem Gefäßsystem des Empfängers anastomosiert wird, wurden mit einem schnellen Scherenschlag möglichst gerade durchtrennt. Ab diesem Zeitpunkt begann die genormte Ischämiezeit. Das entnommene Herz wurde mit ca. 10 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%,

Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) antegrad durch die Aorta perfundiert, wobei sich das Herz blass färbte und die Herzgefäße „ausgewaschen“ wurden. Dabei wurden mit der Kanülenspitze die Klappen, sowohl die Gefäßklappen, als auch die Atrioventrikularklappen, zerstört. Das Herz wurde während der Ischämie in mit physiologischer Kochsalzlösung getränkter Gaze feucht gehalten.

2.2.3.3 Transplantation

Das entnommene Herz wurde nach der Technik von Ono und Lindsey [62], modifiziert nach Schmid [63], mittels mikrochirurgischer Standardtechnik End-zu-Seit an die großen Bauchgefäße des Empfängertieres angeschlossen (siehe Abbildung 3).

Dabei wurde jeweils eine fortlaufende Naht benutzt, die zwischen dem ersten und letzten Stich verknotet wird. Nach Freigabe der Blutzirkulation füllten sich die Koronarien sofort mit Blut und innerhalb der ersten Minuten begann das Herz spontan zu schlagen. Nach Reperfusion des Transplantats endete die Ischämiezeit, die bei diesen Untersuchungen im Mittel ca. 25 Minuten dauerte. Anschließend wurde der Bauch zweischichtig vernäht (die Naht des Musculus rectus abdominis und die Hautnaht erfolgten mit 3/0 Vicryl®-Fäden (Ethicon, Johnson & Johnson, Belgien)).

Abbildung 3: Schematische Darstellung der heterotopen Herztransplantation modifiziert nach Schmid [63]

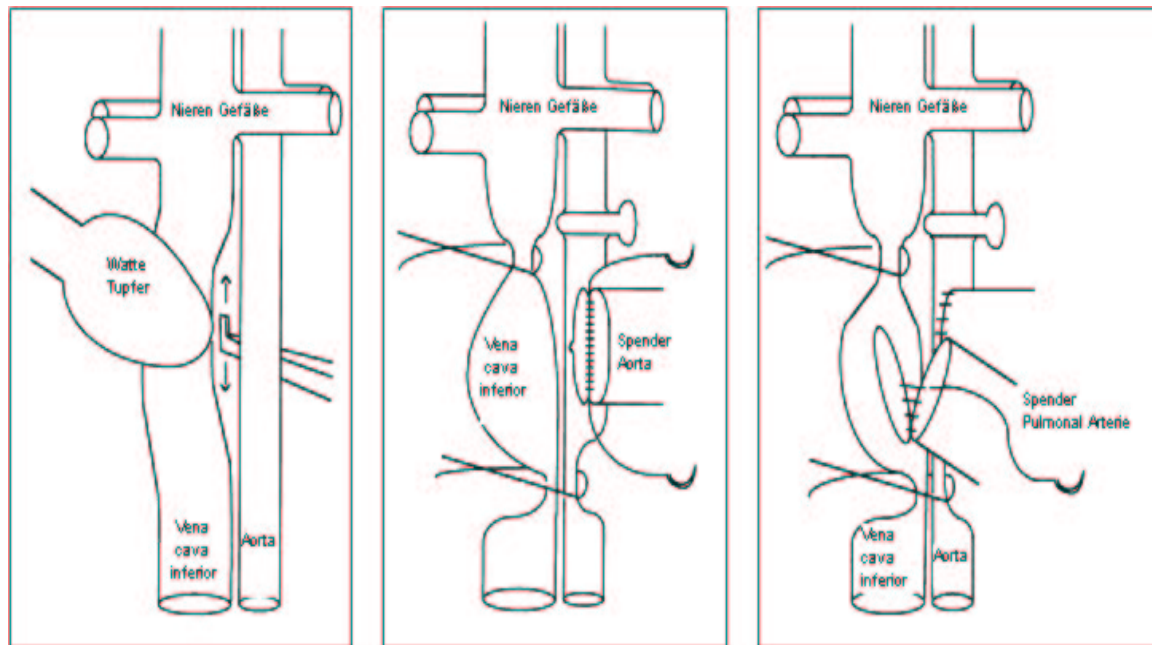


Abb.3: Schematische Darstellung der heterotopen Herztransplantation.

2.2.3.4 Blutflussrichtung im Transplantat

Nach erfolgter Transplantation wird das arterielle Blut dem Transplantat via Aorta abdominalis in den Aortenstumpf zugeführt. Der linke Vorhof und die linke Kammer werden gefüllt und die Koronarien, die direkt oberhalb der Semilunarklappen an der Aorta im sogenannten Bulbus Aortae entspringen, werden gleichzeitig mit dem arteriellen Blut versorgt. Damit ist die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels von hier aus über das kapillare Bett gegeben. Auf der venösen Seite des Kapillarsystems wird das Blut wieder gesammelt und gelangt über den Sinus Coronarius in den rechten Vorhof und danach in den rechten Ventrikel. Von dort wird das Blut über die venöse Anastomose über den Stumpf des Truncus Pulmonalis in die Vena cava inferior geleitet. Damit tritt in den beiden Herzhälften jeweils ein Pendelvolumen auf. Dies ist ein

sogenanntes „*Non working Heart Model*“, da das Transplantat nicht seine physiologische Funktion zur Aufrechterhaltung eines suffizienten Herz-Zeit-Volumens erfüllt, und dabei nicht gegen den physiologischen Druck anpumpen muss. Es ist in heterotroper Position transplantiert. Die immunologischen Prozesse der zellulären Abstoßung, die im Myokard stattfinden, lassen sich jedoch in diesem exzellent etablierten Tiermodell gut untersuchen [62, 64-67].

2.2.4 Transplantatfunktion

Die Kontraktilität des Transplantats wurde täglich manuell durch die Bauchdecke des Empfängertieres beurteilt. Folgender international anerkannter Score wurde für die Einteilung in Funktionsgraden herangezogen [63]:

Tabelle 10: Palpationsscore

Grad	Transplantatfunktion
0	Keine palpable Kontraktion, nach Abdomeneröffnung keine Aktivität des Transplantates mehr zu sehen.
1	Minimale palpable Kontraktion, nach Abdomeneröffnung rhythmische Restaktivität zu sehen.
2	Eine rhythmische Kontraktion ist palpabel.
3	Kräftige, rhythmische Kontraktion palpabel, bei narkotisierten Tieren sieht man das Transplantat durch die Bauchdecke schlagen.

2.2.5 Gruppendesign

Bei allen Tieren wurde die Transplantation wie unter Kapitel 2.2.3.3 Transplantation beschrieben durchgeführt und die Ischämiezeit des Herzens so kurz wie möglich gehalten. Dies ergab Ischämiezeiten von ca. 25 min (24,7 +/- 2,1 min.). Post operativ erfolgte keine Immunsuppression oder immunmodulatorische Therapie. Die Transplantatabstoßung erfolgte auf akute Art und Weise. Zuerst wurde als klinischer Parameter das Transplantatüberleben bestimmt (n=7). Danach wurden zur immunhistologischen und molekularbiologischen Auswertung jeweils am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation die Herzen entnommen (n=4 pro Tag pro Gruppe). Als Kontrolle dienten Herzen von nativen Spendertieren (n=4).

2.2.6 Probenaufbereitung

Zur weiteren Untersuchung erfolgte die Explantation schlagender Herzen an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, um die initiale Phase, die frühe und späte Phase der akuten Abstoßung zu erfassen. Unter Isoflurannarkose wurde bei dem auf dem Rücken fixierten Tier ein vom Xiphoid nach kaudal verlaufender etwa 10 cm langer Schnitt gelegt und das Abdomen eröffnet. Dann wurde der Thorax durch latero-dorsale Rippendurchtrennung aufgeklappt.

Nach Aufsuchen der Aortenbifurkation wurde von dort aus die Aorta abdominalis kanüliert und das Versuchstier mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und exsanguiniert. Anschließend wurde das transplantierte Herz entnommen und asserviert.

Das Herz wurde durch Transversalschnitte bis auf die Herzspitze in 3 gleich dicke Scheiben geteilt und mit dem Gewebekleber Tissue-Tek (O.C.T, 4583 Compound, Sakura Fine technical Europe) auf Korkplättchen geklebt. Die Präparate wurden vollständig mit Tissue-Tek bedeckt und danach in Isopenthan (Roth, Karlsruhe, Deutschland) schockgefroren. Die Herzspitze wurde in 4 gleich große Gewebestücke geschnitten und in Safe-Lock-Tubes® 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die spätere RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Histologische Aufarbeitung

Für die histopathologischen und die immunhistochemischen Färbungen wurden 6 µm dicke Gewebeschnitte mittels eines Kryostaten (Leica, Wetzlar, Deutschland) hergestellt. Diese wurden für 10 Minuten in 4°C kaltem Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und dann bis zur entgültigen Färbung bei –20°C gelagert.

2.3.1.1 Standardfärbung

Für die histopathologische Beurteilung wurde eine Standardfärbung mit Hämatoxylin (Hämalaun® (Merck, Darmstadt, Deutschland)) und Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland) an den 6 µm dünnen Gewebeschnitten durchgeführt. Zur Darstellung der Membrana elastica interna wurde zusätzlich eine Elastica von Gieson Färbung (Resorchin-Fuchsin, (Chroma, Köngen, Deutschland)) durchgeführt.

2.3.1.2 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde die hoch sensitive APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) in einer modifizierten Version nach Cordell angewandt [68]. Die APAAP-Methode ist eine Antikörper-Brücken-Technik für monoklonale Antikörper. Dabei wird die Bindung des spezifischen Primärantikörpers an das Antigen indirekt über die Färbereaktion des APAAP-Komplexes mit einem Substrat nachgewiesen. Nach der Inkubation des Gewebeschnittes mit dem Primärantikörper wird der Zweitantikörper, der polyklonale

Brückenantikörper, aufgetragen. Anschließend fügt man den APAAP-Komplex und als letztes die Substratlösung hinzu (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Der APAAP-Komplex

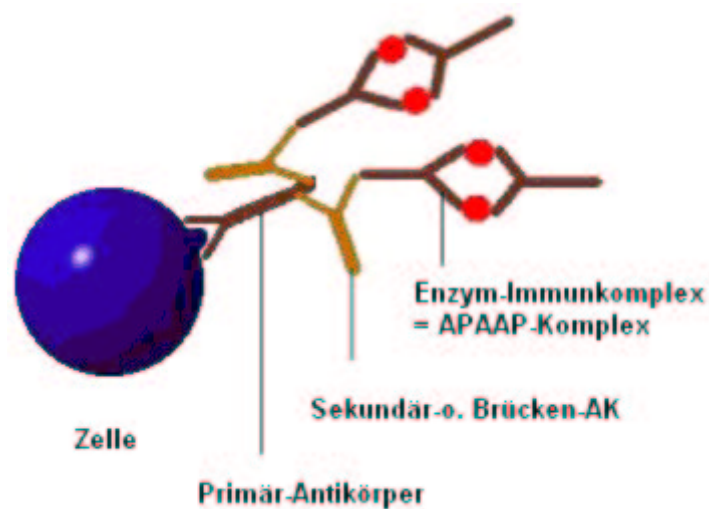


Abb. 4: Der APAAP-Komplex ist ein löslicher Enzym-Anti-Enzymkomplex. Hierbei bindet ein Komplex aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und dem dazugehörigen Antikörper (Antialkalische Phosphatase) mit seinem Fc-Teil an den Fab-Teil des Brückenantikörpers. Um die antikörpermarkierten Zellen zu detektieren, wurden die Präparate in eine neufuchsinhaltige Substratlösung gegeben. Durch die Phosphatgruppe am APAAP-Komplex wurde hierbei eine Neufuchsin-Diazo-Farbreaktion katalysiert.

Zunächst wurden die 6 µm dicken, azetonfixierten Gewebeschnitte 45 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert:

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Name	Wirt	Verdünnung	Hersteller
ICAM-1	mouse monoclonal anti-rat intercellular adhesion molecule	1:75	Seikagaku, Japan
VCAM-1	goat polyclonal anti-rat vascular cell adhesion molecule	1:20	Santa Cruz, USA
ED 1	mouse monoclonal anti-rat ED 1	1:150	Serotec, England
R73	mouse monoclonal anti-rat TCR alpha / beta	1:75	Serotec, England

Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit einer Tris/HCL-gepufferten Kochsalzlösung (Tris-Base, Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Tris-HCL (USB, Cleveland, Ohio, USA und NaCl, Roth, Karlsruhe, Deutschland, pH 7,4-7,6)) gewaschen. Nach zweimaligem Waschen wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten ein sekundärer Antikörper hinzugegeben:

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Name	Wirt	Verdünnung	Hersteller
ICAM-1	rabbit anti-mouse IgG	1:200	DAKO, Deutschland
VCAM-1	mouse anti-goat IgG	1:300	DAKO, Deutschland
ED 1	rabbit anti-mouse IgG	1:200	DAKO, Deutschland
R73	rabbit anti-mouse IgG	1:200	DAKO, Deutschland

Bei Bedarf wurde zusätzlich mit einem Verbindungsantikörper inkubiert:

Tabelle 5: Verbindungsantikörper

Name	Wirt	Verdünnung	Hersteller
VCAM-1	rabbit anti-mouse IgG	1:400	DAKO, Deutschland

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde dem primären und sekundären Antikörpermisch verdünntes Rattenserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland (1:750)) zugesetzt. Nach erneuter Spülung erfolgte die Zugabe des APAAP-Komplexes (DAKO (1:50) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Um die antikörpermarkierten Zellen zu detektieren, wurden die Präparate für 30 Minuten in eine neufuchsinhaltige Substratlösung gegeben. Durch die Phosphatgruppe am APAAP-Komplex wurde hierbei eine Neufuchsin-Diazo-Farbreaktion katalysiert. Nach anschließender Spülung wurde mit Hämalaun® gegengefärbt.

Als Negativkontrolle dienten nicht-transplantierte Herzen. Zur Positivkontrolle wurden je nach Antikörper entweder Schnitte von mit über 8 Stunden mit LPS (Liposaccharide, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) perfundierten Herzen (ICAM-1, VCAM-1, ED1), oder Gewebeschnitte von einer Rattenmilz (TCR alpha/beta) verwendet.

Zur Quantifikation der Adhäsionsmoleküle wurde die Intensität von ICAM-1 und VCAM-1 mittels eines Score-Verfahrens an allen postkapillären Venolen in einem Gewebeschnitt beurteilt. Postkapilläre Venolen ließen sich histologisch am Besten auswerten. Es wurde in 4 Färbegrade eingeteilt. Dabei wurde der Score 0 bei keiner Anfärbung, der Score 1 bei einer minimalen Färbereaktion, der Score 2 einer mittleren und Score 3 bei einer massiven Färbung des Endothels vergeben. Die Immunhistochemie zur Quantifizierung der zellulären Infiltration, bei der Zellen mittels verschiedener, spezifischer Marker detektiert werden können, erfolgte über die Zählung von 10 unterschiedlichen Gesichtsfeldern (bei einer Vergrößerung von 400x) in jeweils 2 verschiedenen Ebenen pro Tier, die zufällig eingestellt wurden.

2.4 Molekularbiologie

2.4.1 Aufarbeitung der Proben

Das Gewebe (Herzspitze) wurde in 4 Stücke zerlegt und einzeln in einem Eppendorf-Gefäß, bei -80°C eingefroren. Das gefrorene Gewebestück wurde mit flüssigem Stickstoff in ein Pistell gegeben und zu einem feinen Pulver zerstoßen. Das Pistell und der Mörser wurden vor Arbeitsbeginn über Nacht in 4%igem H_2O_2 eingelegt und dann bei jeder Probe neu mit autoklavierter Aluminiumfolie ausgekleidet und für einige Minuten mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Das fein zerstoßene Gewebestück wurde mit einem sterilen Skalpell aufgenommen, in ein steriles Eppendorf-Hütchen gegeben und anschließend die RNA isoliert. Für die quantitative Erfassung der Genexpression wurde aus jeder Herzgewebeprobe drei mal RNA isoliert, von jeder RNA wurde drei mal c-DNA synthetisiert

2.4.2 RNA-Isolierung

Die RNA- Isolierung erfolgte nach der Methode von Chromczynski und Sacchi [69] mit dem Roti- Quick- Kit (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

Arbeitsschritte:

Zu dem Gewebe wurden 900 μl Lösung 1 (Guanidinthiozyanat Lösung (50 g Guanidinthiozyanat, 30 ml Aqua dest., 2,5 ml 1M Natriumcitrat, 0,5 g N-Laurylsarkosin, 0,7 ml 2-Mercaptoethanol)) gegeben und mit der Pipette gemischt, bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurden 900 μl Lösung 2 (Phenol und Chlorophorm 24:1) hinzugefügt und gevortext. Das Gemisch wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und zwischendurch 3 mal gevortext, dann erfolgte die Zentrifugation bei 12000 rpm, 15 Minuten bei 4°C . Nach der Zentrifugation wurde die Probe 5 Minuten

auf Eis gestellt, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1 ml Lösung 3 (Isopropanol) gemischt und für 2 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde die Probe 15 Minuten bei 14000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde verworfen und zum Pellet (RNA) jeweils 300 μl Lösung 1 und Lösung 3 zugegeben und wieder für 1 Stunde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut 15 Minuten bei 14000 rpm bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 25 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die optische Dichte (O.D.) der zu messenden RNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Die $\text{O.D.}_{260\text{nm}}$ gibt den Nukleinsäure-Gehalt der Lösung an, während die $\text{O.D.}_{280\text{nm}}$ den Proteingehalt misst. Der Quotient zwischen beiden optischen Dichten ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Aus der $\text{O.D.}_{260\text{nm}}$ einer Lösung wurde die Konzentration der RNA wie folgt bestimmt:

$$\text{O.D.}_{260\text{nm}} \times 0,04 = \text{RNA Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

2.4.4 Reverse-Transkription

Um eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) ausgehend von mRNA durchzuführen, muss diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) umgeschrieben werden.

Zuerst wurde ein sogenannter „*Mastermix*“ erstellt:

Tabelle 6: Mastermix für die Reverse Transkription

	Volumen (μ l)	Hersteller
15nM Random Primer P(dN) ₆	3	Boehringer Mannheim
15 nmol randomisierte Hexanukleotide	10	Gibco BRL
dNTP's (je 10mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	2	Perkin Elmer
10 mM DTT (Dithiothreitol)	5	Gibco BRL
20 U RNAsin	1	Promega
100 U Reverse Transkriptase (moloney murin leukemia virus reverse transcriptase)	2	Gibco BRL

Die RNA-Lösung mit der Konzentration 1 μ g/ μ l wurde mit 23 μ l Mastermix vermischt. Die Synthese der komplementären DNA erfolgte in einem Thermozykler (Promega) während einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C mit anschließender 7-minütiger Inkubation bei 94°C zur Inaktivierung des Enzyms. Die cDNA wurde bis zur PCR-Analytik bei –20°C eingefroren.

2.4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Fragmente angewandt. Das Prinzip beruht darauf, dass man die Nukleinsäuren, mit einem Überschuss von zwei Primern hybridisiert, die aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz stammen und strangspezifisch sind. Dadurch entstehen kurze Doppelstrangbereiche, die für die Taq-Polymerase als Startpunkt dienen. Diese besonders hitzestabile DNA-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*) hat ein Temperatur-Optimum von über 70°C und ist auch bei 95°C für kurze Zeit stabil [70].

Abbildung 6: Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR) modifiziert nach Roche Diagnostics, 1999

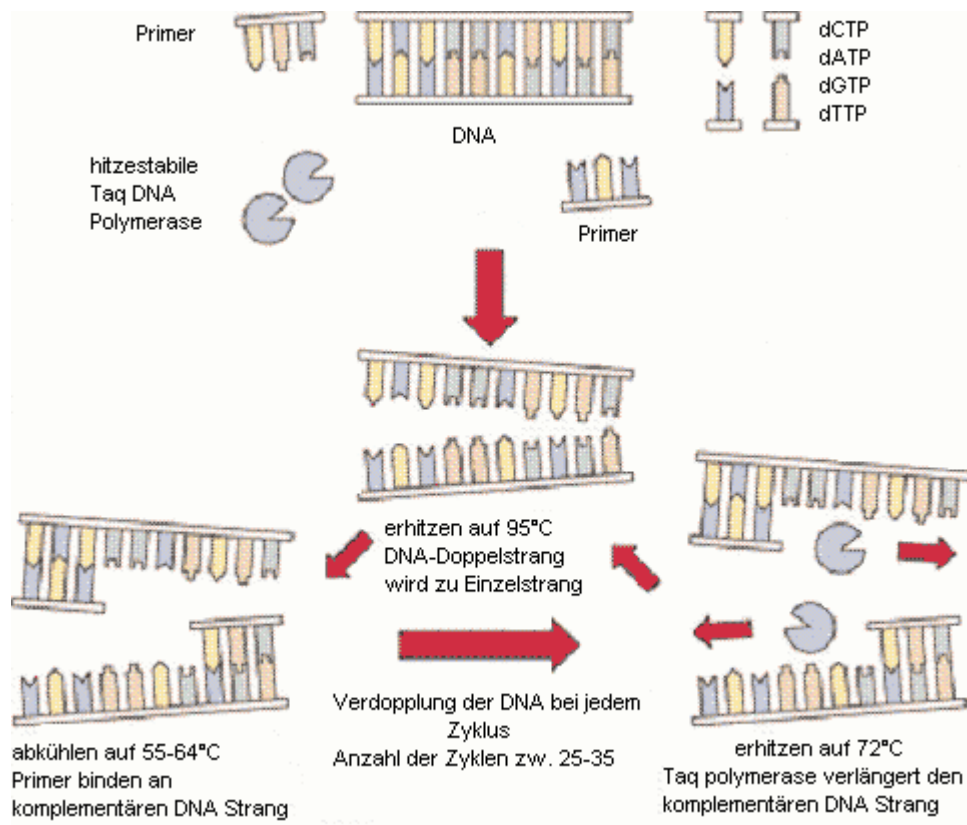


Abb.6. Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion (PCR). Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei einer Temperatur von 95°C. Anschließend erfolgt die Anlagerung genspezifischer Primer. Die Temperatur liegt zwischen 55-64°C und ist primerabhängig. Dann werden mit Hilfe der Taq-Polymerase die Primer verlängert und die komplementären Stränge gebildet. Die optimale Temperatur liegt hier bei 72°C. Diese Schritte geben zusammen einen Zyklus der PCR, welcher zwischen 25-35 mal wiederholt wird.

Zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der synthetisierten cDNA wurden 2 µl cDNA mit einem „*Mastermix*“ auf 23 µl aufgefüllt.

Herstellung des PCR Mix für den internen Standard:

Tabelle 7: PCR-Mastermix für den internen Standard

PCR- Mix	Volumen (µl)	Hersteller
RNAse-freies H ₂ O	19	
Puffer (100 mmol Tris-HCL, pH 8,3, 10 mmol MgCl ₂ , 50 mmol KCL)	2,5	Perkin Elmer
dNTP's (je 10mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	2,5	Perkin Elmer
1µM 3'Primer	1	Metabion
1µM 5'Primer	1	Metabion
0,75 U AmpliTaq DNA Polymerase	0,15	Perkin Elmer

Herstellung des PCR-Mix für alle Primer:

Tabelle 8: PCR-Mastermix für alle Primer

PCR- Mix	Volumen (µl)	Hersteller
RNAse-freies H ₂ O	16	
Puffer (100 mmol Tris-HCL, pH 8,3, 10 mmol MgCl ₂ , 50 mmol KCL)	2,5	Perkin Elmer
dNTP's (je 10mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	2,5	Perkin Elmer
1µM 3'Primer	2,5	Metabion
1µM 5'Primer	2,5	Metabion
0,75 U Ampli Taq DNA Polymerase	0,15	Perkin Elmer

Tabelle 9: Primersequenzen

Ratten Primer	Sequenz der Primer	Annealing Temp.	Anzahl der Zyklen	PCR- Produkte (bp)	Literatur- Quelle
IL-1 β	5'- GCT ACC TAT GTC TTG CCC GT -3' 5'- GAC CAT TGC TGT TTC CTA GG -3'	60°C	27	542	Segel, 2002 [71]
IL-2	5'- CAG GAT GGA GAA TTA CAG GAA CCT -3' 5'- AAA TCC AGA ACA TGC CGC A -3'	60°C	35	156	freundliche Gabe von Dr. Randolf, Universität Marburg
IL-2 R	5'- GCC AGC TGC TTC ACC AAC CA -3' 5'- GAG AAG AGC AGC AGG TCA TC -3'	60°C	25	227	Segel, 2002 [71]
MCP-1	5'- ATG CAG GTC TCT GTC ACG -3' 5'- CTA GTT CTC TGT CAT ACT -3'	55°C	32	447	Taal, 2000 [72]
RANTES	5'- CCA TAT GGC TCG GAC ACC A -3' 5'- GCT CAT CTC CAA ATA GTT -3'	55°C	35	221	Nadeau, 1995 [61]
TNF- α	5'- GGT GAT CGG TCC CAA CAA GGA -3' 5'- CAC GCT TCA GCC ACT C -3'	61°C	30	173	Grandel, 2000 [73]
ICAM-1	5'- CAA CTG GAA GCT CTT CAA GCT G -3' 5'- TAG TCG GAA GAT CGA AAG TCC G -3'	60°C	27	428	Segel, 2002 [71]
VCAM-1	5'- CAA GGG TGA CCG TCT CAT GA -3' 5'- TGT GCA GCC ACC TGA GAT CC -3'	60°C	25	519	Segel, 2002 [71]
PBGD	5'- CAA GGT TTT CAG CAT CGC TAC CA -3' 5'- ATG TCC GGT AAC GGC GGC -3'	59°C	35	135	Grandel, 2000 [73]

Interleukin-1 beta, **Interleukin-2**, **Interleukin-2 Rezeptor**, **Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)**, **Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)**, **Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)**, **Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)**, **Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)**, **Porphobilinogen deaminase (PBGD)**

Thermozyklerbedingungen:

Zytokine: 95°C für 4 Min., 95°C für 45 Sek., Annealing (55 °C - 64 °C) für 1 Min., 72°C für 1 Min., 72°C für 4 Min.

Porphobilinogen deaminase (PBGD) (*Interner-Standard*): 95°C für 6 Min., 95°C für 20 Min., 59°C für 30 Sek., 73°C für 7 Min., 73°C für 7 Min.

2.4.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten

Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente in einer Agarosematrix nach Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNA von der Kathode zur Anode, wobei kleine Fragmente schneller durch die Agarosematrix wandern als große Fragmente.

Zur Herstellung eines 2,5%igen Agarosegels wurde zunächst 1,25 g Agarose durch Aufkochen in 50 ml TAE-Puffer (0,1 M Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde die Agaroselösung mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt und in eine Flachbett-Gelkammer gegossen. Zur Bildung von Geltaschen wurde ein Kamm eingefügt. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Probepuffer gemischte DNA in die Taschen pipettiert. Als Leiter wurden 4 µl eines DNA/ Hinf I –Markers (Promega) mit einer Konzentration von 1 mg/ml mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 100 V. Danach erfolgte die quantitative, densitometrische Auswertung der DNA-Fragmente unter ultraviolettem Licht mit dem Bio-Imaging Analyzer (Bio Doc II / NT, Biometra). Die Intensität (=Helligkeit) der Banden wurde sichtbar gemacht und in elektronische Daten umgewandelt (Bio Doc II / NT, Biometra, Göttingen, Deutschland). Zur vergleichenden Analyse der Ergebnisse wurde die Expression der Zielgene in Beziehung zu der Expression des Internen Standard-Gens PBGD gesetzt. Die Ergebnisse stellen sich somit als Quotienten dar.

2.5 Statistik

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Auswertung erfolgte mit StatsDirect statistical software, Version 2,2,3. Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen wurden mittels Kruskal-Wallis Test (Rang-Summen-Test) verglichen. Als signifikant galten Werte $p \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

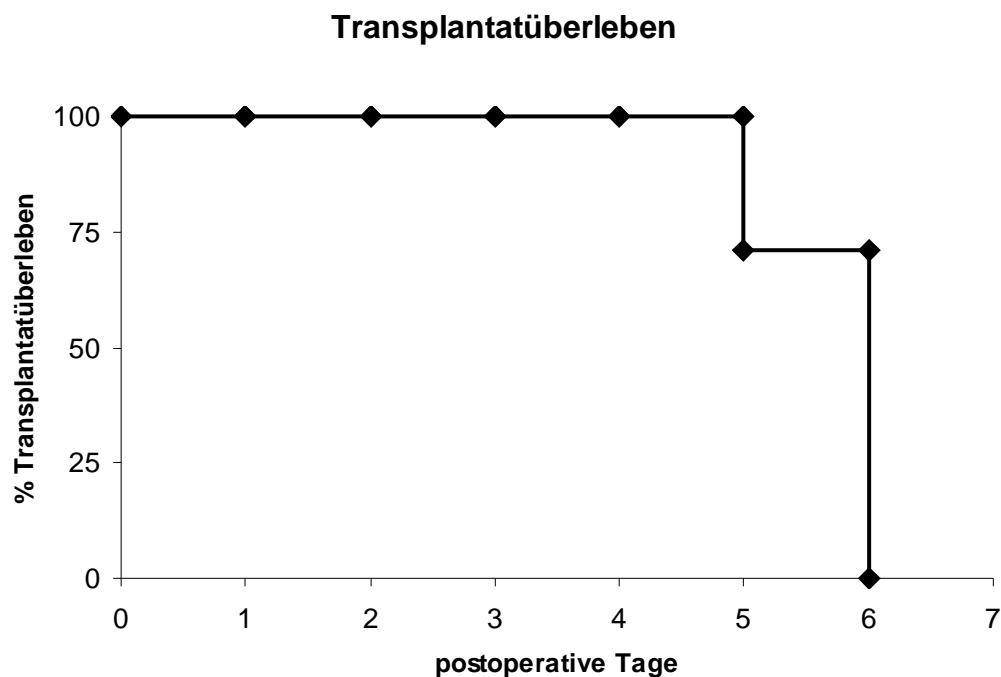
3.1 Transplantatüberleben

Bei allen Transplantationen, die in die Versuchsreihe aufgenommen wurden, schlugen die Herzen kurze Zeit nach Reperfusion kräftig und gleichmäßig. Die Organe zeigten schnell wieder eine kräftig rote Farbe und die Koronarien wurden gut durchblutet.

Die Herzen wurden innerhalb von 7 Tagen nach der Operation abgestoßen.

Diagramm 1: Transplantatüberleben in Tagen post OP bei unbehandelten Tieren.

Die Organe wurden innerhalb von 7 Tagen abgestoßen (n=7).



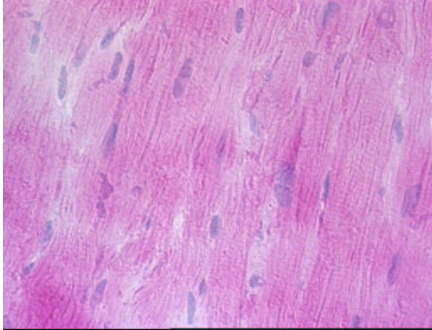
3.2 Akute Transplantatabstoßung

3.2.1 Kinetik der akuten Transplantatabstoßung auf histologischer und immunhistochemischer Ebene

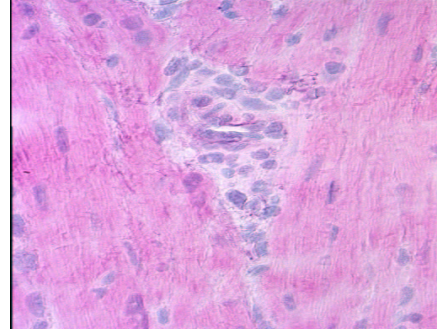
Während des zeitlichen Verlaufes der Abstoßung kam es histologisch zu einer progredient zunehmenden zellulären Infiltration der Transplantate mit mononukleären Zellen, wie in Abbildung 8 demonstriert ist.

Die Abbildung 8 illustriert die histologischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung. An Tag 1 nach Transplantation kommt es fokal zu perivaskulären Infiltraten, die sich am dritten Tag nach Transplantation in das umliegende Interstitium ausbreiten. Im Verlauf der akuten Abstoßung ist an Tag 6 nach der Transplantation eine diffuse zelluläre Infiltration mit Ödembildung und Myozytennekrose im gesamten Transplantat zu sehen.

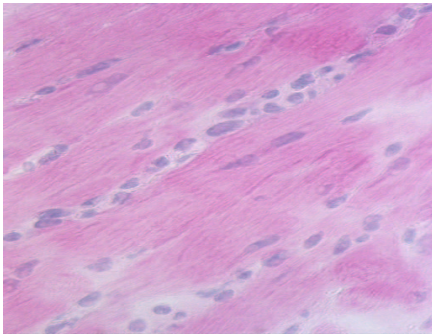
Abbildung 8: Zelluläre Infiltration



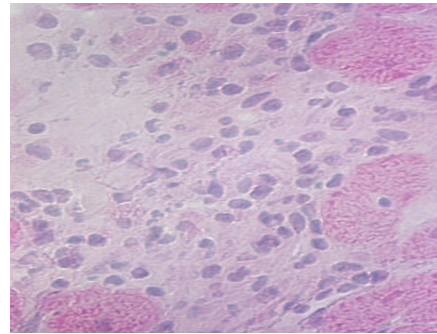
Native Kontrolle



Tag 1



Tag 3



Tag 6

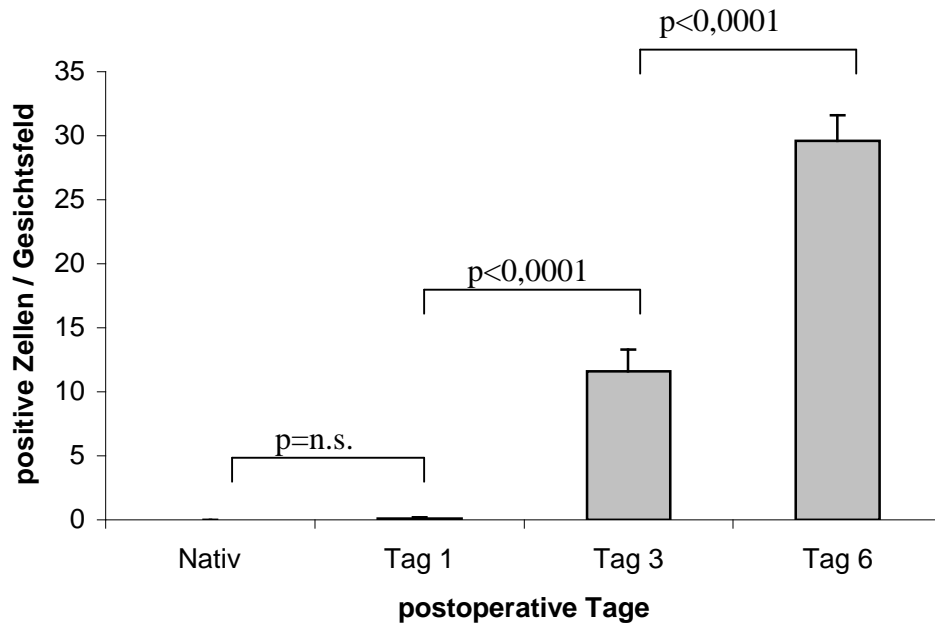
Abb. 8: H&E Färbung, Infiltration des Transplantates mit mononukleären Zellen. Die das Transplantat infiltrierenden Zellen sind durch den blau angefärbten Zellkern zu erkennen. Das umliegende Zytoplasma ist zum Kontrast rot angefärbt. Vergrößerung 100x.

3.2.1.1 T-Zell Infiltration

T-Zellen sind durch die Expression des T-Zellrezeptors auf der Zelloberfläche charakterisiert. Dieser besteht aus einer α - und β -Kette. R73 ist ein Antikörper gegen die α - und β -Ketten des T-Zellrezeptors und somit ein Marker für T-Zellen.

Abbildung 9 zeigt, dass bei den nativen Kontrollherzen keine R73 positiven Zellen in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden konnten. Transplantate, die am ersten Tag nach der Transplantation entnommen wurden, zeigten ebenfalls keine Infiltration mit T-Zellen, im Gegensatz zu Transplantaten, die am dritten oder sechsten Tag nach Transplantation entnommen wurden. Diese zeigten eine signifikante zelluläre Infiltration mit R73 positiven T-Zellen (Tag 1 vs. Tag 3, $p < 0,0001$; Tag 3 vs. Tag 6, $p < 0,0001$). Siehe Werte in Diagramm 2.

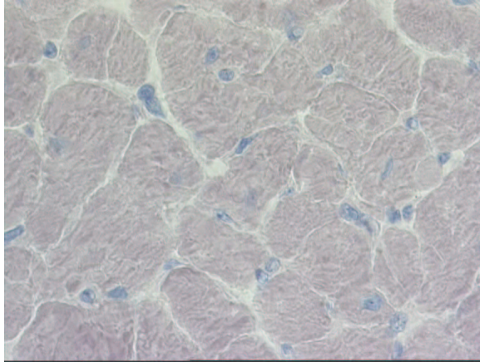
Diagramm 2: Immunhistochemie R73 positive T-Zellen



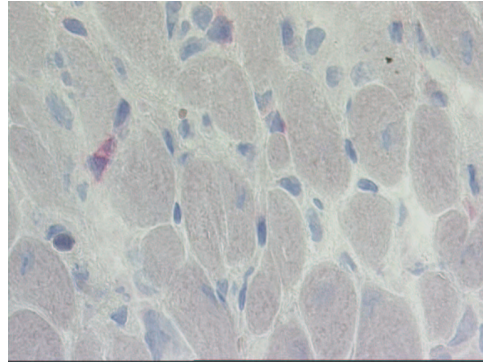
R73	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW±SEM	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	11,3 ± 1,7	29,6 ± 2,0

Diagramm 2: Immunhistochemie R73 positive T-Zellen, dargestellt als Mittelwerte ± SEM, n=4 pro Tag.

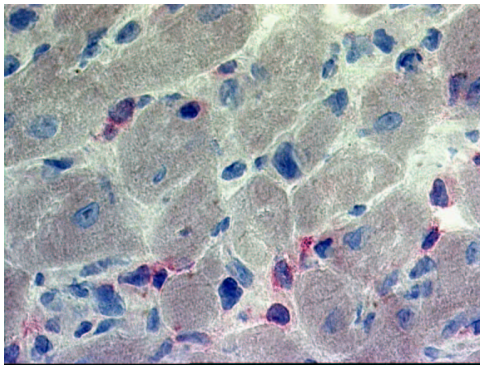
Abbildung 9: Immunhistochemie R73 positive T-Zellen



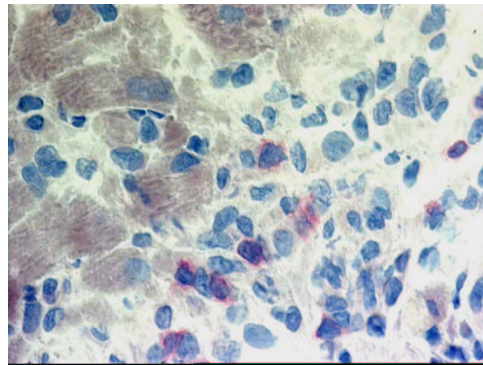
Native Kontrolle



Tag 1



Tag 3



Tag 6

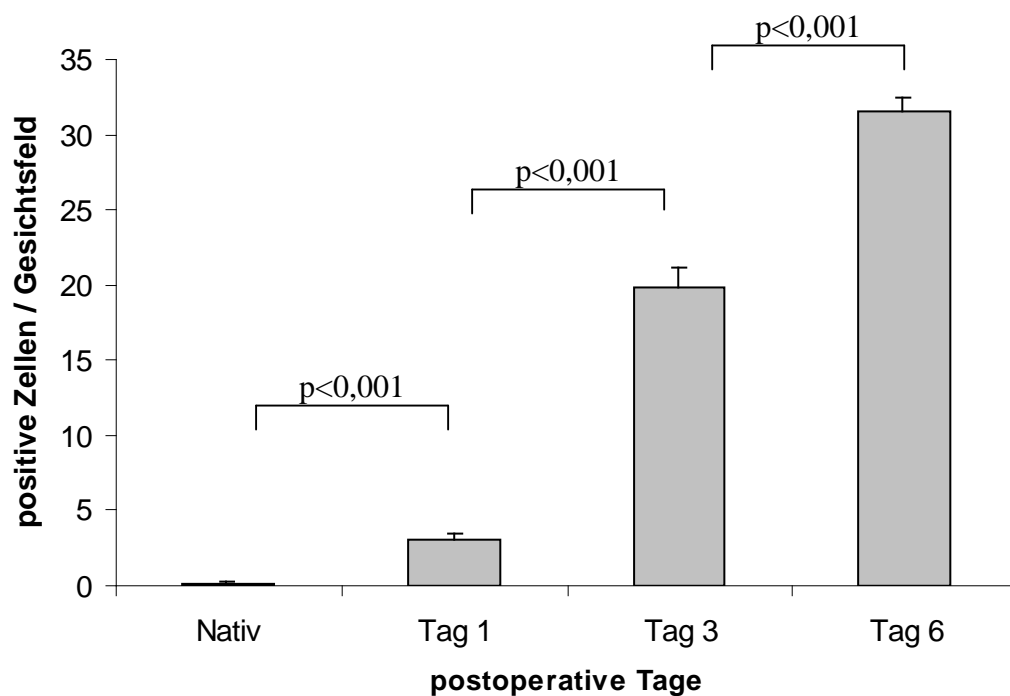
Abb. 9: Immunhistochemie R73 positive T-Zellen. R73 positive T-Zellen sind rot angefärbt. Vergrößerung 400x.

3.2.1.2 Monozyten/Makrophagen Infiltration

ED-1 ist ein Marker für Monozyten und Makrophagen.

Abbildung 10 zeigt, dass bei den nativen Kontrollherzen keine Infiltration mit ED-1 positiven Zellen in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden konnte. Bei den Proben, die am ersten Tag nach der Transplantation entnommen wurden, zeigte sich eine minimale Infiltration mit ED-1 positiven Zellen in den Gewebeschnitten. Am dritten und sechsten Tag nach der Transplantation zeigte sich ein Anstieg mit ED-1 positiven Zellen in den Transplantaten. (Nativ vs. Tag 1, $p<0,001$; Tag 1 vs. Tag 3, $p<0,001$; Tag 3 vs. Tag 6, $p<0,001$). Werte siehe Diagramm 3.

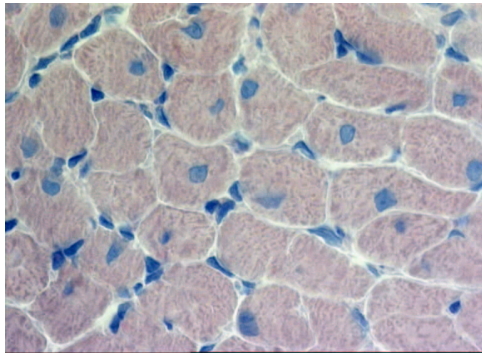
Diagramm 3: Immunhistochemie ED-1 positive Zellen



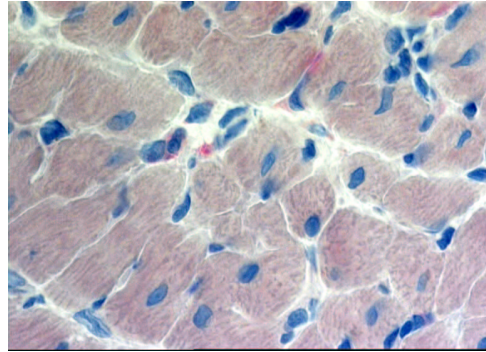
ED 1	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW±SEM	0,1 ± 0,1	3,1 ± 0,4	19,8 ± 1,3	31,6 ± 0,9

Diagramm 3: Immunhistochemie ED-1 positive Zellen, dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, n=4 pro Tag.

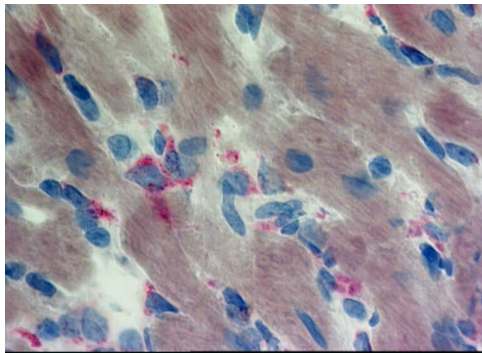
Abbildung 10: Immunhistochemie ED-1 positive Zellen



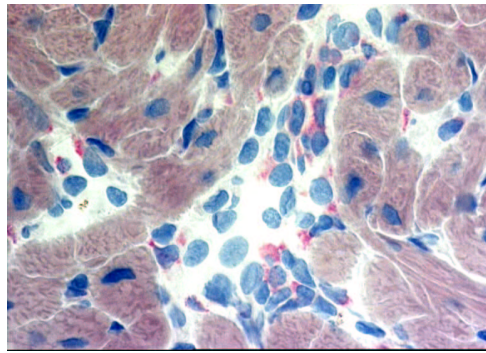
Native Kontrolle



Tag 1



Tag 3



Tag 6

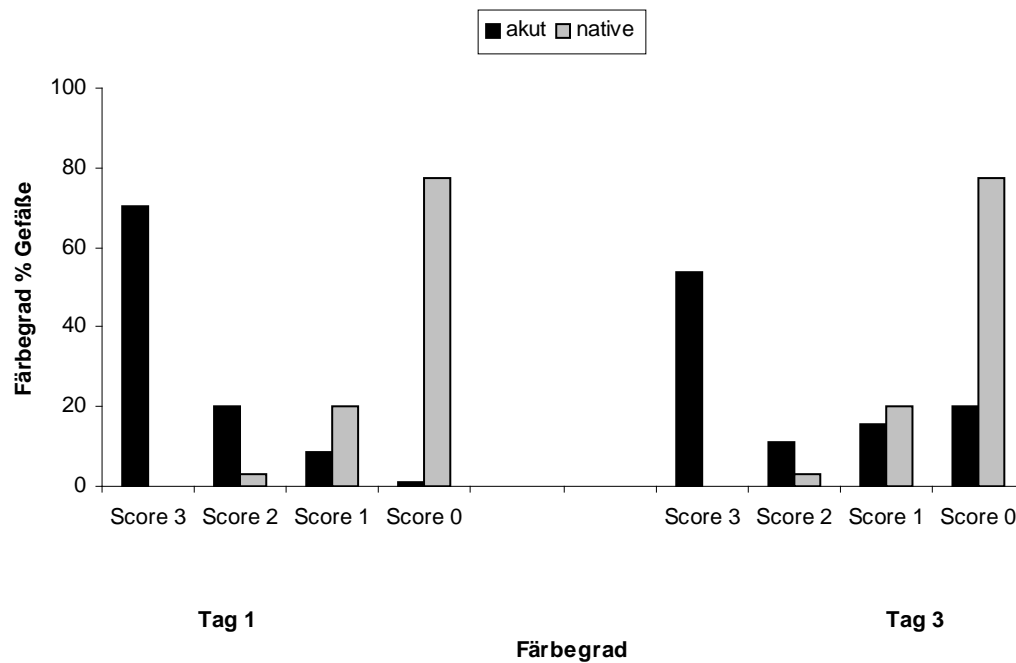
Abb. 10: Immunhistochemie ED-1 positive Zellen. ED-1 positive Zellen sind rot markiert. Vergrößerung 400x.

3.2.1.3 Kinetik der ICAM-1 Expression

Zur Auswertung des Expressionsgrades der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 an postkapillären Venolen wurde ein semiquantitatives Scoring-Verfahren eingesetzt. Hierzu erfolgte die Einteilung in 4 unterschiedliche Färbegrade. Der Score 0 bedeutet keine Anfärbung, der Score 1 eine minimale Färbung, der Score 2 eine mittlere und Score 3 eine starke Anfärbung des Endothels.

Die Abbildung 11 zeigt, dass die Analyse der postkapillären Venolen auf die Expression von ICAM-1 bei nativen Kontrollherzen zu fast 80 % einen Score von 0 ergab. Nur ca. 20% der postkapillären Venolen zeigten eine geringe ICAM-1 Expression (Score 1). Am ersten Tag der akuten Abstoßung hingegen zeigten die überwiegende Mehrzahl der postkapillären Venolen einen Färbegrad von 2 und 3. Im weiteren Verlauf der akuten Abstoßung kam es am dritten Tag nach der Transplantation zu keiner weiteren Zunahme der Expression von ICAM-1 auf postkapillären Venolen. (Nativ vs. Tag 1, $p < 0,0001$; Nativ vs. Tag 3, $p = \text{n.s.}$; Tag 1 vs. Tag 3, $p < 0,0001$). Siehe Werte in Diagramm 4.

Diagramm 4: Immunhistochemie ICAM-1

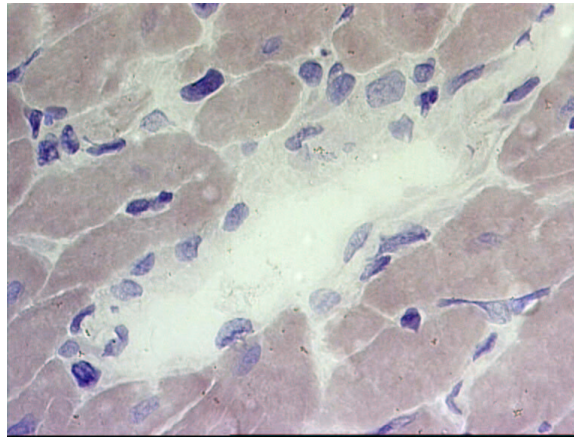


ICAM-1	Nativ	Tag 1	Tag 3
Score 3	0	70,5	53,6
Score 2	3	20	11
Score 1	20	8,4	15,5
Score 0	77,2	1,2	20

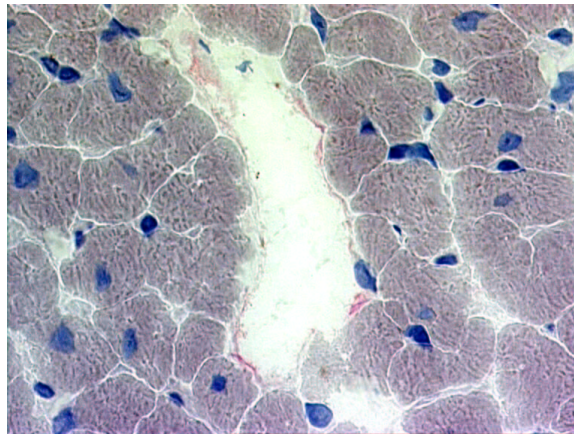
Diagramm 4: Immunhistochemie ICAM-1. Dargestellt sind akute und native Tiere im Vergleich zur Anfärbbarkeit mittels eines Scoring-Verfahrens des Endothels in Färbegrad % Gefäße.

Abbildung 11: Immunhistochemie ICAM-1

**Native
Kontrolle**



Tag 1



Tag 3

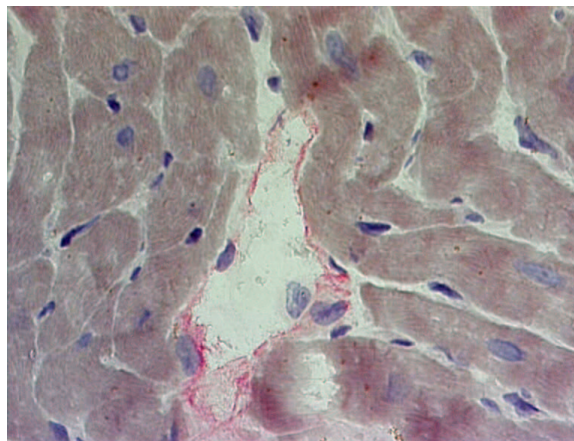
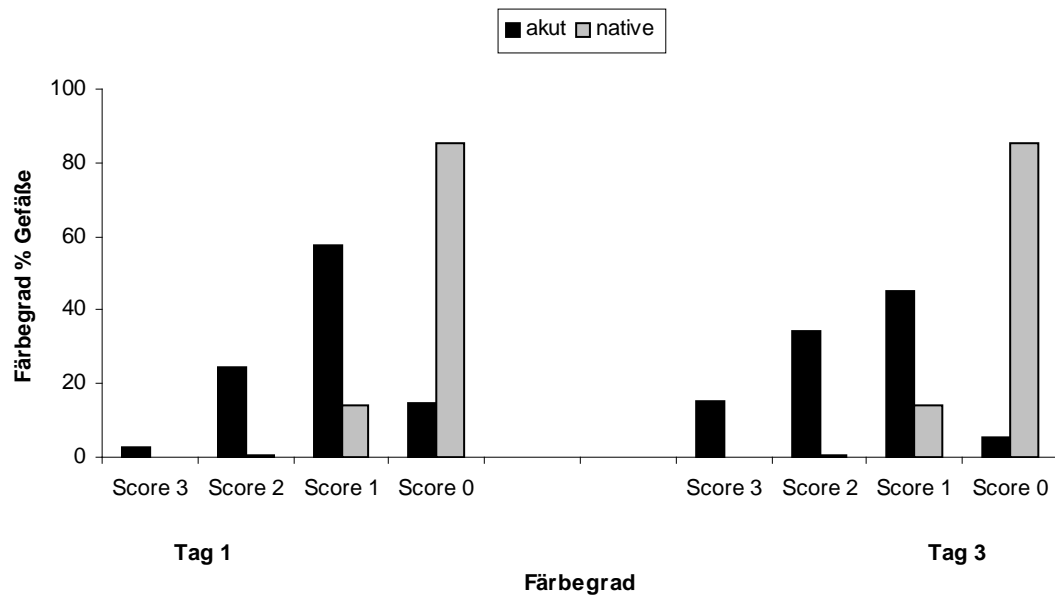


Abb. 11: Immunhistochemie ICAM-1. ICAM-1 wird auf dem Endothel rot markiert dargestellt. Vergrößerung 400x.

3.2.1.4 Kinetik der VCAM-1 Expression

Die Abbildung 12 illustriert, dass die Analyse der postkapillären Venolen auf die Expression von VCAM-1 bei den nativen Kontrolltieren zu über 80% einen Score von 0 ergab. Nur ca. 15% der postkapillären Venolen zeigten eine geringe Expression (Score 1). Am ersten Tag der akuten Abstoßung zeigten fast 60% der postkapillären Venolen eine geringe Expression (Score 1) und fast 15% der postkapillären Venolen eine mittlere Expression (Score 2). Am dritten Tag der akuten Abstoßung kam es zu keinem weiteren Anstieg der Expression von VCAM-1 auf postkapillären Venolen. Es waren nur noch 45% der postkapillären Venolen gering anfärbbar (Score 1) und 35% der postkapillären Venolen zeigten eine mittlere Expression (Score 2). (Nativ vs. Tag 1, $p < 0,0001$; Nativ vs. Tag 3, $p < 0,0001$; Tag 1 vs. Tag 3, $p < 0,0001$). Siehe Werte in Diagramm 5.

Diagramm 5: Immunhistochemie VCAM-1

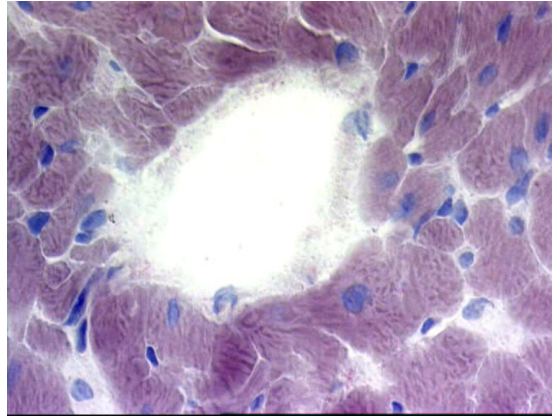


VCAM-1	Nativ	Tag 1	Tag 3
Score 3	0	2,6	15,2
Score 2	0,7	24,7	34,1
Score 1	13,9	57,8	45,2
Score 0	85,4	14,9	5,5

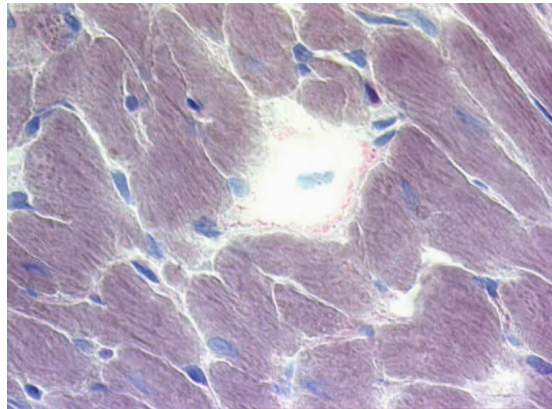
Diagramm 5: Immunhistochemie VCAM-1. Dargestellt sind akute und native Tiere im Vergleich zur Anfärbbarkeit mittels eines Scoring-Verfahrens des Endothels in Färbegrad % Gefäße.

Abbildung 12: Immunhistochemie VCAM-1

**Native
Kontrolle**



Tag 1



Tag 3

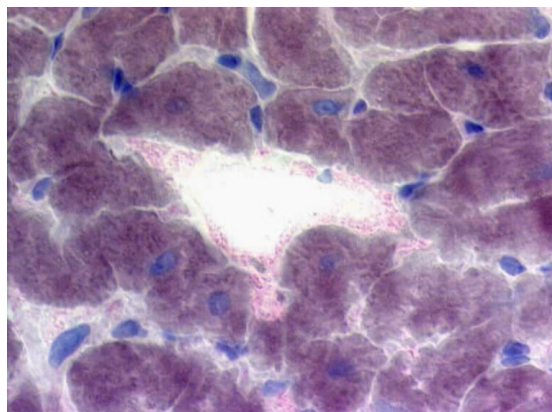


Abb. 12: Immunhistochemie VCAM-1. VCAM-1 wird auf dem Endothel rot markiert dargestellt. Vergrößerung 400x.

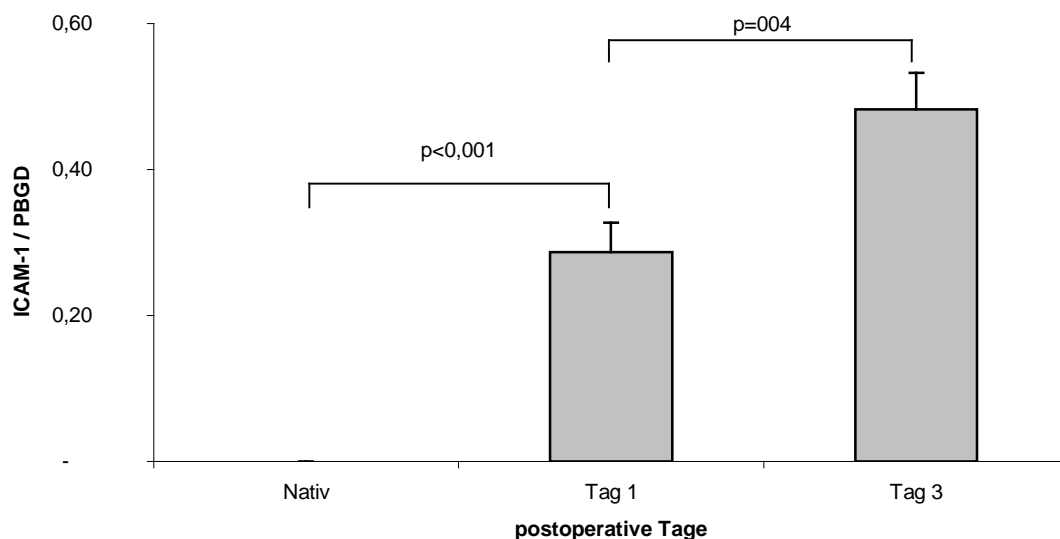
3.2.2 Kinetik der akuten Transplantatabstoßung auf molekularbiologischer Ebene

3.2.2.1 Kinetik der ICAM-1 Genexpression

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR konnte der relative Expressionsgrad von ICAM-1 und VCAM-1 in den Gewebeproben bestimmt werden .

Auf mRNA Ebene konnte man bei den nativen Kontrolltieren keine Expression von ICAM-1 nachweisen. An Tag 1 der akuten Abstoßung kam es zu einem hoch signifikanten Anstieg der ICAM-1 Genexpression (Nativ vs. Tag 1, $p < 0,0001$). Im weiteren Verlauf der akuten Abstoßung kam es an Tag 3 nach der Transplantation zu einem weiteren signifikanten Anstieg der ICAM-1 Genexpression (Tag 1 vs. Tag 3, $p = 0,04$; Nativ vs. Tag 3, $p < 0,0001$). (siehe Abbildung 13, Werte siehe Diagramm 6).

Diagramm 6: Genexpression von ICAM-1



ICAM-1	Nativ	Tag 1	Tag 3
MW ± SEM	0,0 ± 0,0	0,29 ± 0,04	0,48 ± 0,05

Diagramm 6: Genexpression von ICAM-1. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=4).

Abbildung 13: Gelelektrophoretische Darstellung der ICAM-1 m-RNA-Genexpression

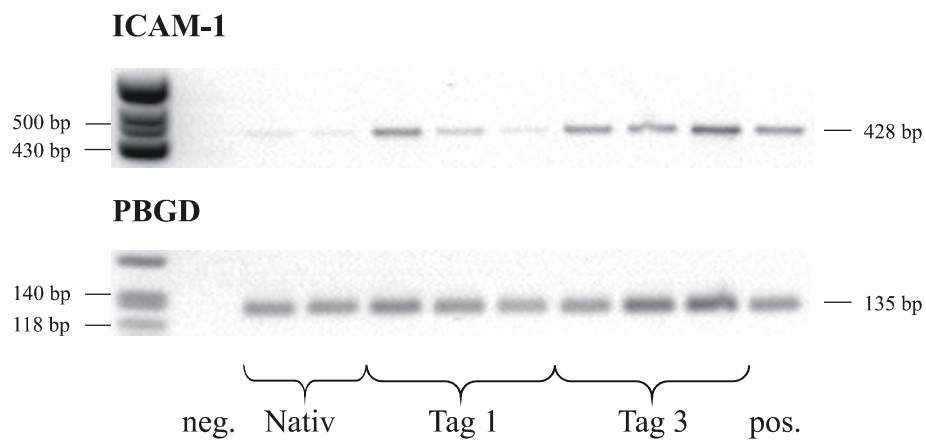
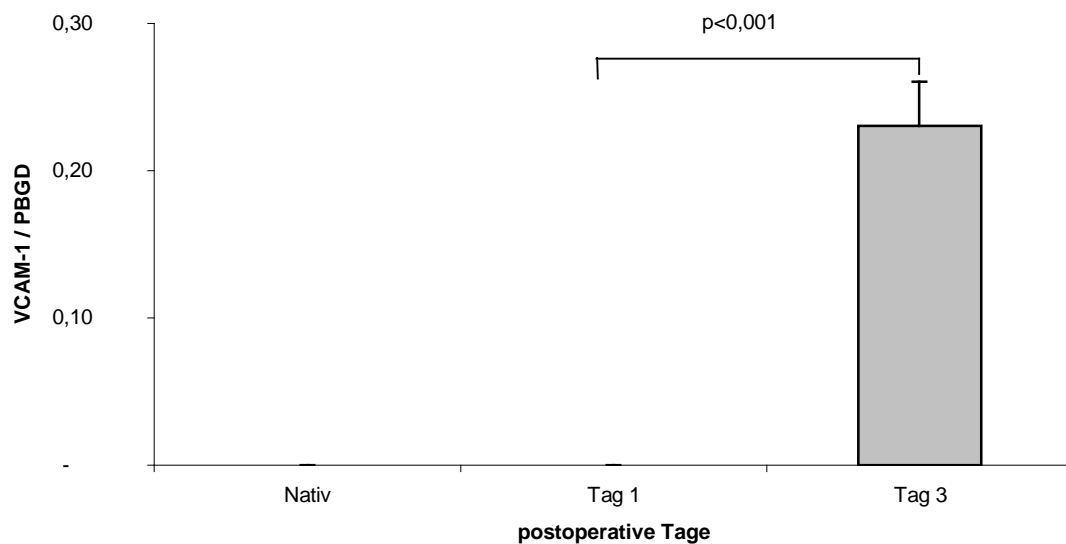


Abb. 13: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der ICAM-1 m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

3.2.2.2 Kinetik der VCAM-1 Genexpression

Auch VCAM-1 konnte auf mRNA Ebene bei den Kontrolltieren nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu ICAM-1 kam es bei VCAM-1 erst am dritten Tag nach der Transplantation zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression (Tag 1 vs. Tag 3, $p < 0,0001$). (siehe Abbildung 14, Werte siehe Diagramm 7).

Diagramm 7: Genexpression von VCAM-1



VCAM-1	Nativ	Tag 1	Tag 3
MW ± SEM	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,25 ± 0,03

Diagramm 7: Genexpression von VCAM-1. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=4).

Abbildung 14: Gelelektrophoretische Darstellung der VCAM-1 m-RNA-Genexpression

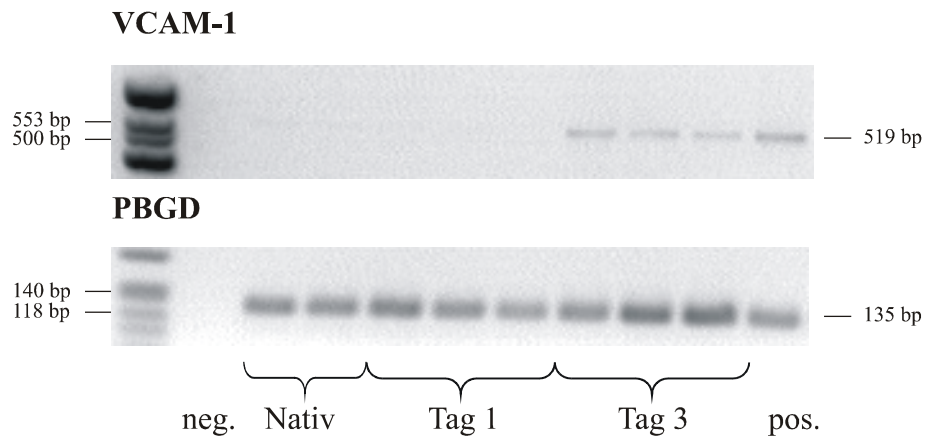
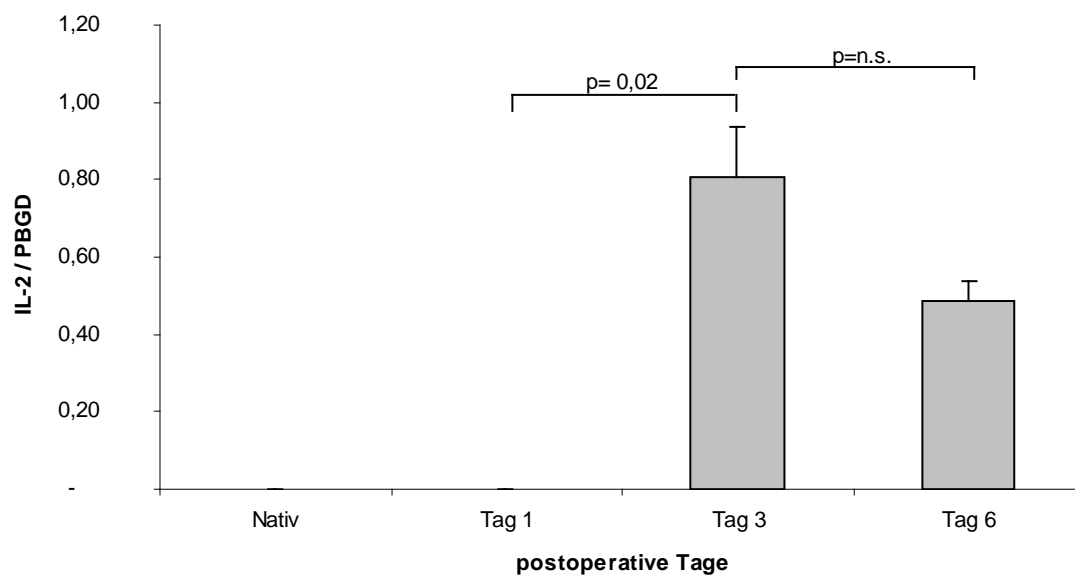


Abb. 14: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der VCAM-1 m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

3.2.2.3 Kinetik der IL-2 Genexpression

Die Expression von Interleukin-2 (IL-2) konnte auf transkriptioneller Ebene bei den nativen Kontrolltieren nicht nachgewiesen werden. In den Proben von Tag 3 nach der Transplantation kam es zu einer signifikanten IL-2 Genexpression (Nativ vs. Tag 3, $p=0,04$; Tag 1 vs. Tag 3, $p=0,02$). Am sechsten Tag nach der Transplantation kam es zu einem Abfall der IL-2 Genexpression (Nativ vs. Tag 6, $p=0,04$; Tag 1 vs. Tag 6, $p=0,02$; Tag 3 vs. Tag 6, $p=n.s.$). (siehe Abbildung 15, Werte siehe Diagramm 8).

Diagramm 8: Genexpression von IL-2



IL-2	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW ± SEM	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,81 ± 0,12	0,48 ± 0,05

Diagramm 8: Genexpression von IL-2. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=4).

Abbildung 15: Gelelektrophoretische Darstellung der IL-2 m-RNA-Genexpression

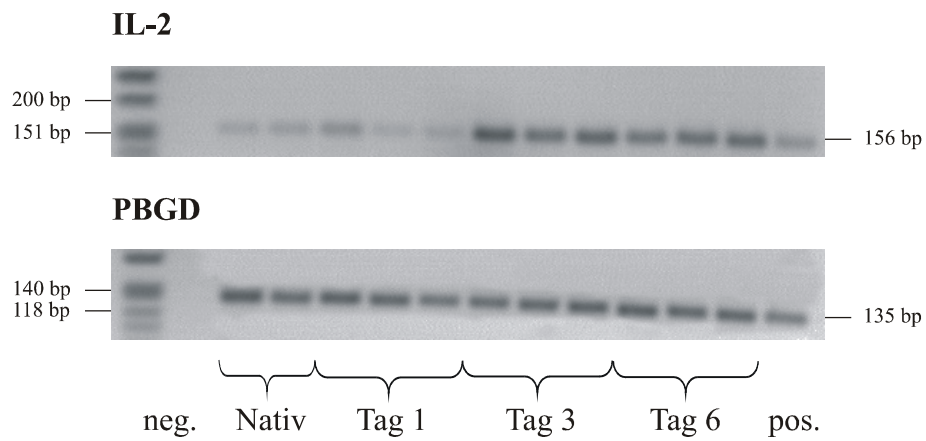
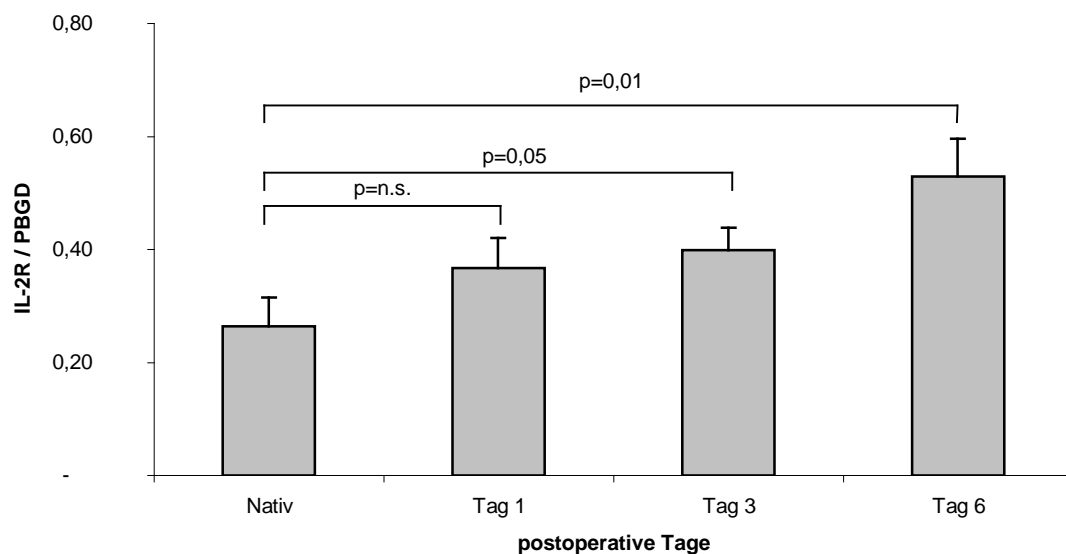


Abb. 15: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der IL-2 m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

3.2.2.4 Kinetik der IL-2R Genexpression

Die Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R) Genexpression konnte schon bei den nativen Kontrolltieren nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der akuten Abstoßung kam es zu einem stetigen, nicht signifikanten Anstieg der IL-2R Genexpression bis zum Tag 6 nach der Transplantation (Nativ vs. Tag 1, $p=n.s.$; Tag 1 vs. Tag 3, $p=n.s.$; Tag 3 vs. Tag 6, $p=n.s.$). (siehe Abbildung 16, Werte siehe Diagramm 9).

Diagramm 9: Genexpression von IL-2R



IL-2 R	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW±SEM	0,26 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,40 ± 0,04	0,53 ± 0,07

Diagramm 9: Genexpression von IL-2R. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=4).

Abbildung 16: Gelelektrophoretische Darstellung der IL-2R m-RNA-Genexpression

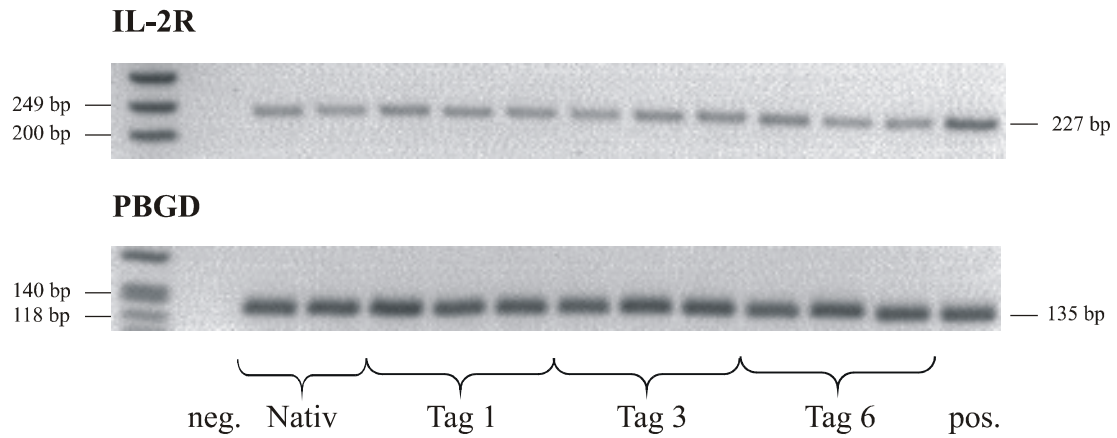
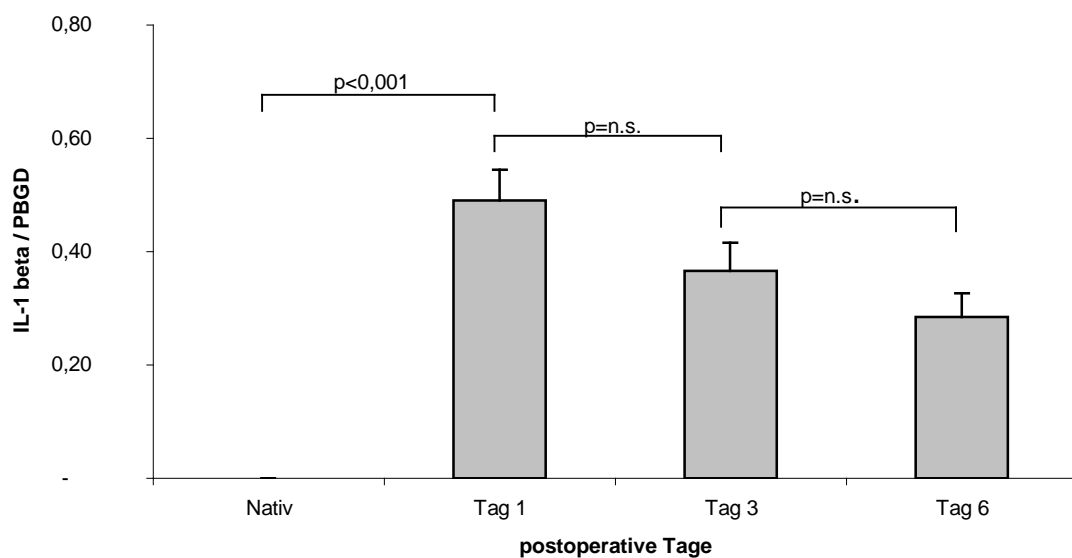


Abb. 16: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der IL-2R m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

3.2.2.5 Kinetik der IL-1 β Genexpression

Auf transkriptioneller Ebene konnte die Genexpression von Interleukin-1 β (IL-1 β) ab dem Tag 1 nach der Transplantation hochsignifikant nachgewiesen werden (Nativ vs. Tag 1, $p < 0,001$). Die IL-1 β Genexpression fiel bis zum sechsten Tag nach der Transplantation ab (Nativ vs. Tag 3, $p < 0,001$; Tag 1 vs. Tag 3, $p = \text{n.s.}$; Nativ vs. Tag 6, $p < 0,001$; Tag 3 vs. Tag 6, $p = \text{n.s.}$). (siehe Abbildung 17, Werte siehe Diagramm 10).

Diagramm 10: Genexpression von IL-1 β



IL-1 β	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW \pm SEM	0,0 \pm 0,0	0,49 \pm 0,05	0,37 \pm 0,05	0,29 \pm 0,04

Diagramm 10: Genexpression von IL-1 β . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=4).

Abbildung 17: Gelelektrophoretische Darstellung der IL-1 β m-RNA-Genexpression

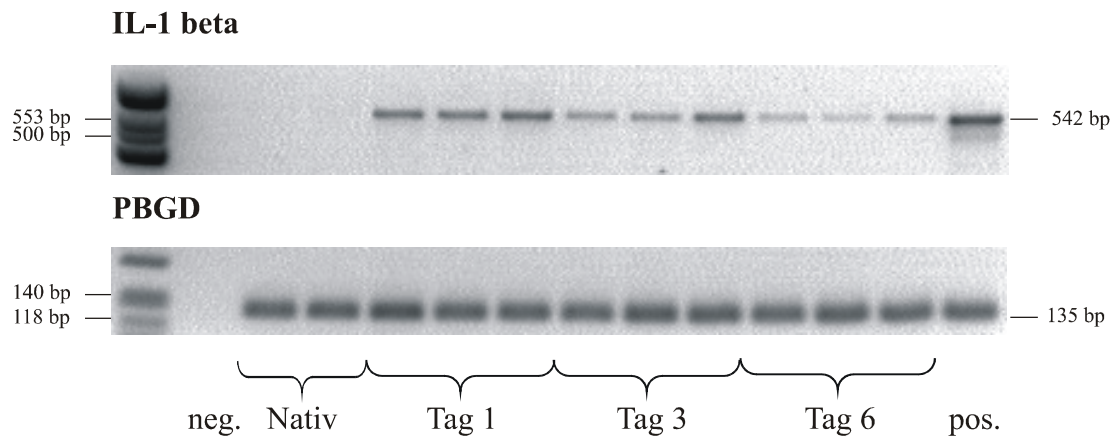
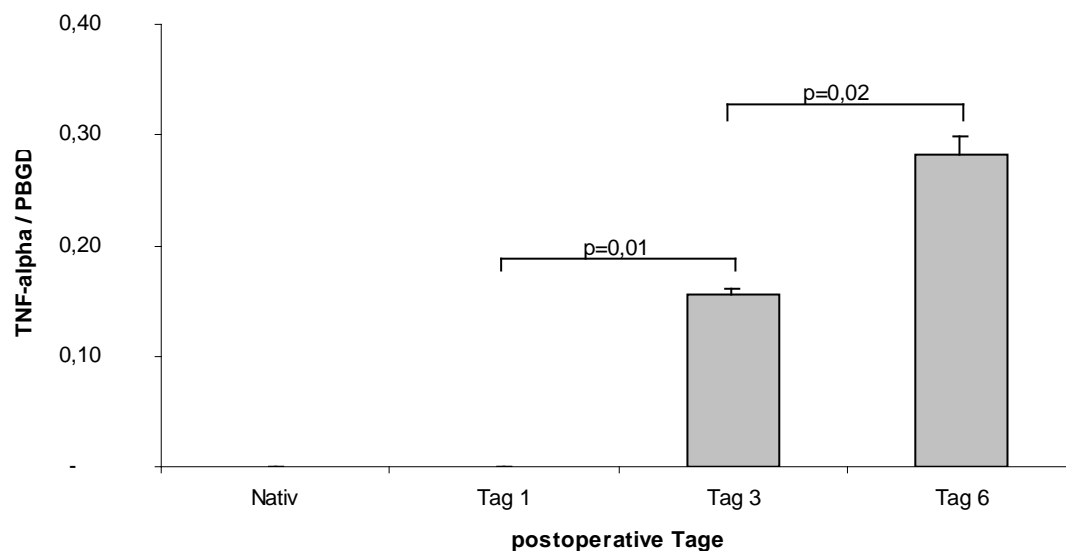


Abb. 17: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der IL-1 β m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

3.2.2.6 Kinetik der TNF- α Genexpression

Die Expression des Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) konnte auf transkriptioneller Ebene signifikant ab dem dritten Tag nach der Transplantation nachgewiesen werden (Nativ vs. Tag 3, $p=0,01$; Tag 1 vs. Tag 3, $p=0,01$). Im weiteren Verlauf bis zum Tag 6 verdoppelte sich die Genexpression von TNF- α signifikant (Nativ vs Tag 6, $p=0,01$; Tag 1 vs. Tag 6, $p=0,01$; Tag 3 vs. Tag 6, $p=0,02$), d.h. es kam zu einer Hochregulierung in den Proben. (siehe Abbildung 18, Werte siehe Diagramm 11).

Diagramm 11: Genexpression von TNF- α



TNF- α	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW \pm SEM	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,16 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01

Diagramm 11: Genexpression von TNF- α . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=4).

Abbildung 18: Gelelektrophoretische Darstellung der TNF- α m-RNA-Genexpression

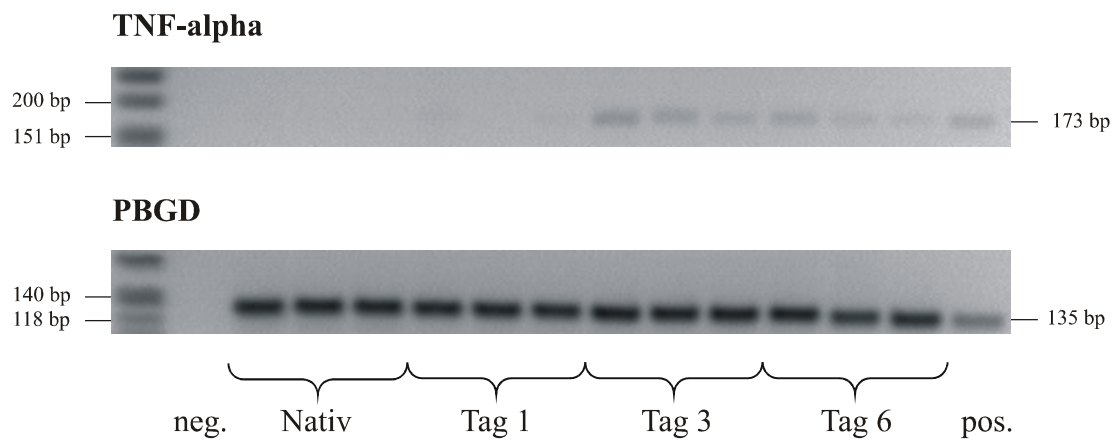
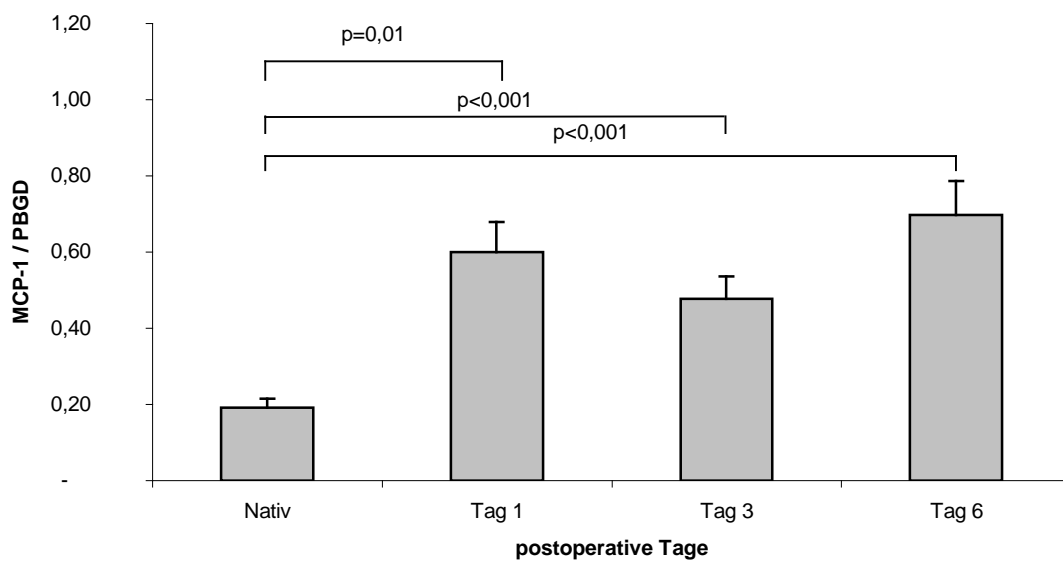


Abb. 18: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der TNF- α m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

3.2.2.7 Kinetik der MCP-1 Genexpression

Die Expression von MCP-1 auf transkriptioneller Ebene konnte schon bei den nativen Kontrolltieren nachgewiesen werden. An Tag 1 nach der Transplantation kam es zu einem signifikanten Anstieg (Nativ vs. Tag 1, $p < 0,01$) der MCP-1 Genexpression. An Tag 3 fiel die MCP-1 Genexpression leicht ab (Nativ vs. Tag 3, $p = 0,01$; Tag 1 vs. Tag 3, $p = \text{n.s.}$), an Tag 6 nach der Transplantation kam es dann wieder zu einem Anstieg der MCP-1 Genexpression (Nativ vs. Tag 6, $p < 0,01$; Tag 1 vs. Tag 6, $p = \text{n.s.}$; Tag 3 vs. Tag 6, $p = \text{n.s.}$). (siehe Abbildung 19, Werte siehe Diagramm 12).

Diagramm 12: Genexpression von MCP-1



MCP-1	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW±SEM	0,19 ± 0,02	0,6 ± 0,08	0,48 ± 0,06	0,7 ± 0,09

Diagramm 12: Genexpression von MCP-1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n=4$).

Abbildung 19: Gelelektrophoretische Darstellung der MCP-1 m-RNA-Genexpression

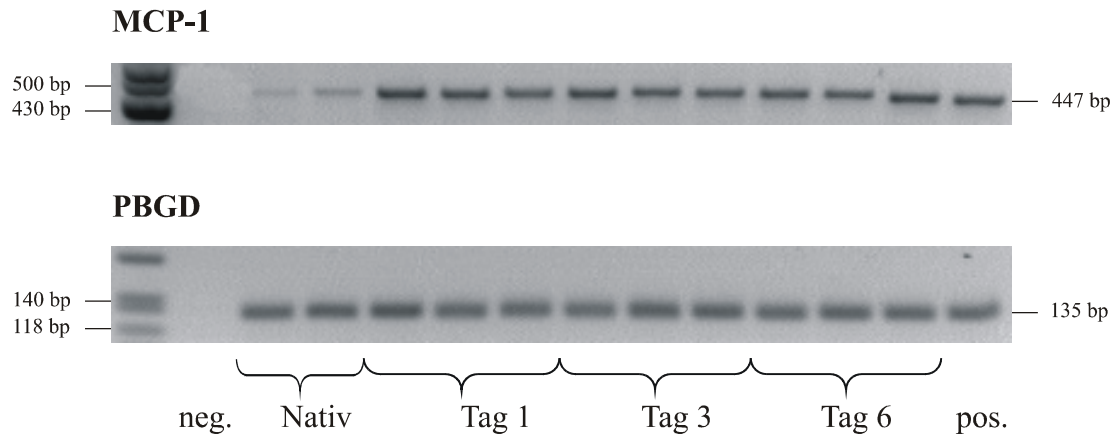
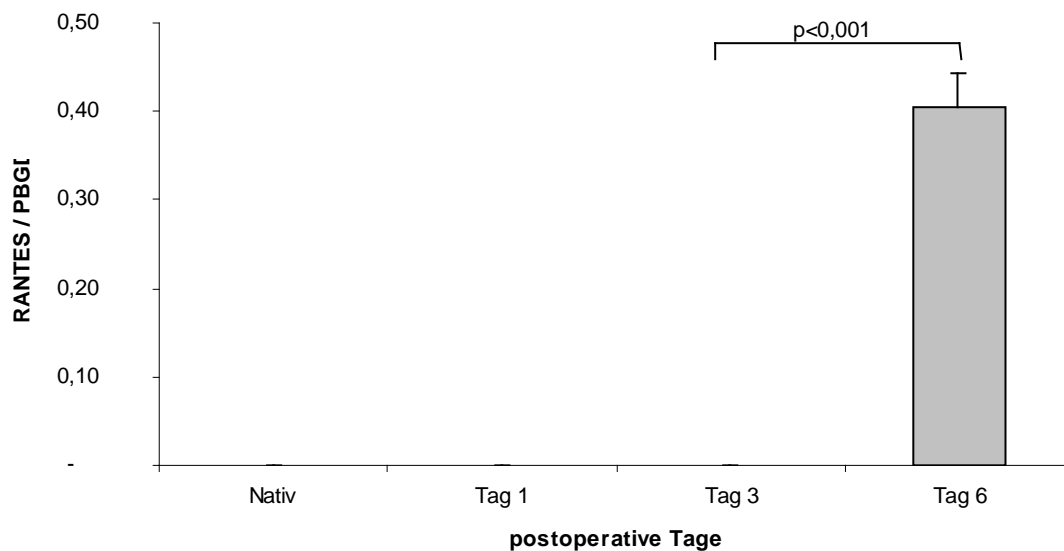


Abb. 19: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der MCP-1 m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

3.2.2.8 Kinetik der RANTES Genexpression

RANTES konnte auf transkriptioneller Ebene nur an Tag 6 nach der Transplantation hochsignifikant nachgewiesen werden (Nativ vs. Tag 6, $p < 0,0001$; Tag 1 vs. Tag 6, $p < 0,001$; Tag 3 vs. Tag 6, $p < 0,001$). (siehe Abbildung 20, Werte siehe Diagramm 13).

Diagramm 13: Genexpression von RANTES



RANTES	Nativ	Tag 1	Tag 3	Tag 6
MW±SEM	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,04

Diagramm 13: Genexpression von RANTES. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=4).

Abbildung 20: Gelelektrophoretische Darstellung der RANTES m-RNA-Genexpression

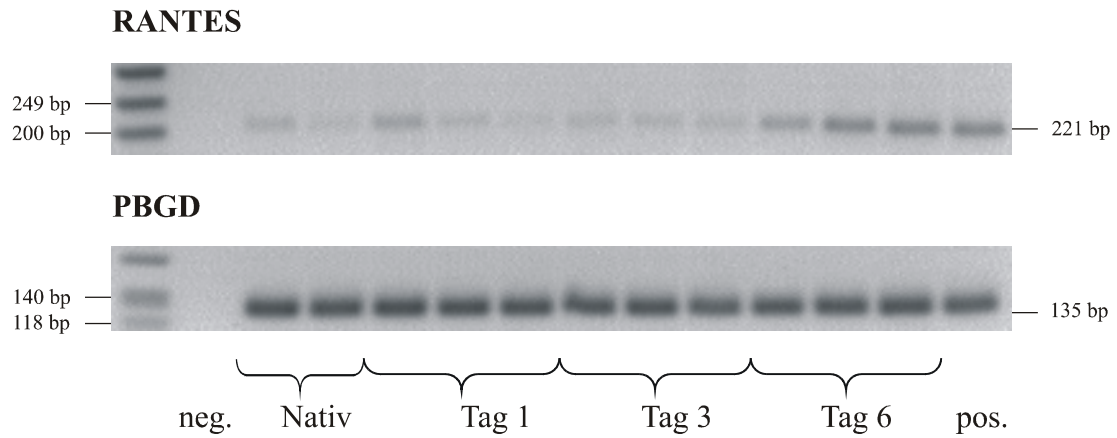


Abb. 20: Repräsentative Gelelektrophoretische Darstellung der RANTES m-RNA-Genexpression. Unten: internes Standardgen PBGD, linker Bildrand: Basenpaarleiter.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Aktivierung des Immunsystems im Rahmen der akuten Abstoßung des transplantierten Herzens wurde ein Rattenmodell in einer Spender-, Empfängerkombination von Wistar-Furth (WF, RT-1^u) auf Lewis (LEW, RT-1^l) benutzt.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Ohne Immunsuppression erfolgt die akute Transplantatabstoßung nach 7 Tagen. Es kommt zu einer vollständigen Zerstörung des Transplantats.
2. Histologisch kommt es im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung zu einer progredienten Infiltration der Transplantate mit mononukleären Zellen.
3. Immunhistochemisch kommt es in der Frühphase der akuten Abstoßung zu einem Anstieg der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 von Tag 1 bis zu Tag 3 an den postkapillären Venolen. Auch auf mRNA-Ebene lässt sich ein Anstieg der Genexpression von ICAM-1 und zeitlich verzögert auch von VCAM-1 nachweisen.
4. Immunhistochemisch stieg die Zahl der T-Zellen und der Monozyten/Makrophagen, die das Transplantat infiltrieren im zeitlichen Verlauf der akuten Abstoßung von Tag 1 bis Tag 6 an.
5. Die Expression von IL-2 sowie des IL-2 Rezeptors konnten auf transkriptioneller Ebene in den Transplantaten im Verlauf der Abstoßung nachgewiesen werden. IL-2 wird bei den Proben ab dem Tag 3 exprimiert. Die Expression des IL-2 Rezeptors ist schon bei den nativen Kontrollherzen nachweisbar und steigt kontinuierlich bis zum Tag 6 nach Transplantation an. Das Interleukin IL-1 β konnte auf transkriptioneller Ebene ab dem Tag 1 nachgewiesen werden und fiel dann bis zum Tag 6 kontinuierlich ab. Die

Expression des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF- α) konnte auf transkriptioneller Ebene ab dem Tag 3 nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf bis zu Tag 6 verdoppelte sich der Expressionsgrad, d.h. es kam zu einer weiteren Hochregulierung in den Proben.

6. Auf transkriptioneller Ebene konnte die MCP-1 Genexpression schon bei den nativen Kontrolltieren nachgewiesen werden. Von Tag 1 bis Tag 6 nach Transplantation kam es zu einem Anstieg der Genexpression von MCP-1. RANTES konnte auf transkriptioneller Ebene erst an Tag 6 nach Transplantation nachgewiesen werden.

4.2 Transplantatabstoßung

Ohne Immunsuppression kam es ab dem 3. Tag nach Transplantation zu einer Abnahme der Organfunktion. In diesem vollständig allogenen Transplantationsmodell ohne Immunsuppression waren alle Herzen an Tag 7 nach Transplantation abgestoßen. Das heißt, zwischen Spender- und dem Empfängertier besteht eine MHC Klasse I und MHC Klasse II Inkompatibilität. Dies entspricht der Situation bei der klinischen Herztransplantation.

4.3 Zelluläre Infiltration im zeitlichen Verlauf

In dieser Studie konnte man histologisch während des zeitlichen Verlaufes der akuten Abstoßung eine progrediente Infiltration der Transplantate mit mononukleären Zellen beobachten. Im weiteren Verlauf der akuten Abstoßung kommt es zu ödematösen und nekrotischen Veränderungen als morphologisches Korrelat der akuten Abstoßungsreaktion. Am 7. Tag nach Transplantation sind alle Herzen abgestoßen.

Die akute Transplantatabstoßung ist charakterisiert durch die progrediente Infiltration von mononukleären Zellen des Empfängers in das Transplantat. Wenige Stunden nach der Revaskularisation infiltrieren Empfänger-Lymphozyten in perivaskuläre Bereiche und wandern in das umliegende Interstitium ein. Im Laufe des Inflamationsprozesses kommt es zu einem diffusen Anstieg von mononukleären Zellen im gesamten Transplantat, was zur Gewebsnekrose führt [74-76].

4.4 Adhäsionsmoleküle

In diesem Modell konnte immunhistochemisch ein kontinuierlichen Anstieg der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 an postkapillären Venolen von Tag 1 bis Tag 3 festgestellt werden. Bei den nativen Kontrollherzen konnte keine ICAM-1 und VCAM-1 Expression nachgewiesen werden.

Die Expression von Adhäsionsmolekülen spielt eine wichtige Rolle in der Frühphase der akuten Abstoßung. Tullius [77] konnte zeigen, dass Zellinfiltrationen in Nierentransplantaten parallel zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen zu beobachten waren. Mit Fortschreiten des Abstossungsprozesses war eine zunehmende Anfärbung im Bereich der Nierentubuli zu finden. Diese Dynamik deutet auf die Rolle von ICAM-1 bei einer initialen Adhärenz von Lymphozyten an Gefäßen des Transplantates zur Einleitung des Abstossungsprozesses hin. Die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen ist ein notwendiger Schritt für die Migration von Zellen in das umgebende Gewebe. Damit Leukozyten in das Transplantat infiltrieren, müssen sie an dem Endothel anhaften und durch das Endothel hindurchwandern. Durch den operativen Eingriff der Transplantation, einschließlich Ischämie/Reperfusionsschaden, wird das Endothel des Transplantats aktiviert und exprimiert Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine, welche die Rekrutierung von Empfänger Leukozyten in das Transplantat vermitteln, sowie kostimulatorische Moleküle. Zusätzlich exprimieren aktivierte Endothelzellen MHC Moleküle Klasse I und II auf ihrer Oberfläche und vermitteln so antigenabhängige Signale an CD8+ und CD4+ T-Zellen. Kommen nun Empfänger-Leukozyten mit dem Spender Endothel in Kontakt, exprimiert das Endothel Adhäsionsmoleküle. Zuerst werden Selektine exprimiert. Diese vermitteln den ersten Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel, sie führen zu einem lockeren Anhaften der Leukozyten. Da diese Bindung nur sehr schwach ist, werden in der späteren Phase die zu Immunglobulin-Familie gehörenden Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1 und VCAM-1) gebildet. Sie sind für die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel verantwortlich [78].

Auch *Lemstrom* [35] zeigte in einem allogenen Herztransplantationsmodell an Ratten, immunhistochemisch bei nativen Tieren eine geringe ICAM-1 Expression an Kapillaren und postkapillären Venolen. Eine geringe Expression von ICAM-1 und VCAM-1 wurde auch in syngenem Transplantaten beobachtet. Während der akuten Abstoßung in allogenen Transplantaten an den Tagen 1-6 nach Transplantation, kam es zu einer Zunahme der ICAM-1 und VCAM-1 Expression. *Taylor* [12] untersuchte immunhistochemisch Myokardbiopsien von herztransplantierten Patienten und konnte

eine basale Expression von ICAM-1, und weniger intensiv auch von VCAM-1, in normalen transplantierten Herzen beobachten. Im Rahmen der akuten Abstoßung kam es zu einem Anstieg von ICAM-1 und VCAM-1 auf dem Endothel von Arteriolen, Venolen und Kapillaren. Weitere Autoren berichten über eine Zunahme der Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen [79-83] im Verlauf der akuten Transplantatabstoßung. In einer longitudinalen Studie an Myokardbiopsien von humanen Herztransplantierten konnte *Briscoe* [84] VCAM-1 immunhistochemisch in der Phase der akuten Abstoßung nachweisen, in Verbindung mit einer steigenden Leukozyteninfiltration in das Gewebe. ICAM-1 dagegen konnte schon vor dem Nachweis einer klinischen oder pathologischen Abstoßung sichtbar gemacht werden.

VCAM-1 konnte auch in Haut [85], in abgestoßenen Nieren Allotransplantaten [86-88] und in abgestoßenen Herz Allotransplantaten [89, 90] fokalisiert in Venolen sichtbar gemacht werden. *Carlos* [36] beschreibt eine Korrelation zwischen der Expression von VCAM-1 und dem Grad der Transplantatabstoßung, während er keine Assoziation zwischen der Expression von ICAM-1 und akuter Abstoßung sieht.

Auch *Denton* [41] beschreibt, dass die VCAM-1 Expression assoziiert ist mit einer T-Zell Rekrutierung auf der Seite der Inflammation. Daher könnte die Expression von VCAM-1 in der klinischen Diagnostik als ein Surrogat Marker für die Präsenz von aktivierten T-Zellen im Transplantat bzw. der Abstoßung sein [36, 41].

Auf transkriptioneller Ebene konnte in diesem Modell eine zunehmende Expression von ICAM-1 an Tag 1 mit einem fast doppelten Anstieg an Tag 3 detektiert werden. ICAM-1 war bei den nativen Kontrollherzen auf transkriptioneller Ebene nicht nachzuweisen. VCAM-1 konnte auf transkriptioneller Ebene nur an Tag 3 nachgewiesen werden. Bei den nativen Kontrollherzen kam es zu keiner VCAM-1 Genexpression.

Auf transkriptioneller Ebene konnte VCAM-1 erst an Tag 3 nach Transplantation detektiert werden, während mit immunhistochemischer Methode VCAM-1 bereits an Tag 1 nach Transplantation nachzuweisen war. Eine Erklärung wäre, dass VCAM-1 vielleicht in sog. Weibel-Palade-Körper als Protein gespeichert wird. Weibel-Palade-Körper sind Abkömmlinge des Golgi-Apparates [91], die im Zytoplasma von humanen

Endothelzellen lokalisiert sind. Weibel-Palade-Körper beinhalten unter anderem P-Selektin, den von Willebrand-Faktor (vWF) und IL-8. Verschiedene Stimuli, wie Thrombin, Komplementfaktoren, Hypoxie und Inflammation veranlassen die Ausschüttung des Inhalts [91, 92]. Die unterschiedlichen Expressionsmuster auf Transkriptions- und Translationsebene können auch durch verschiedene Faktoren, wie mRNA Stabilität, posttranskriptionelle Regulation der Proteinexpression oder Proteinstabilität verursacht sein [93].

Die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen bei der Transplantatabstoßung zeigte sich in Tierexperimenten sowohl an Nagetieren als auch an Primaten, sowie im Bereich der humanen Nierentransplantation. Es wurde getestet, ob Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle die Fähigkeit besitzen, die akute Transplantatabstoßung zu unterdrücken oder Toleranz zu induzieren. Die Ergebnisse waren teilweise kontrovers, konnten aber alle zeigen, dass eine Blockierung von Adhäsionsmolekülen für die Akzeptanz von Transplantaten alleine nicht ausreichend ist.

So konnte *Isobe* in einem allogenen Mäuse-Herztransplantationsmodell eine Akzeptanz der Transplantate nach Blockierung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 zeigen [94]. Die Adhäsion von Lymphozyten konnte reduziert werden. Dies spricht dafür, dass noch weitere Adhäsionsmoleküle in diesen Prozess involviert sind. Die Verabreichung eines monoklonalen Antikörpers gegen VCAM-1 verlängerte das Transplantatüberleben in allogenen Maus- und Rattenherzen, induzierte aber keine Toleranz [37, 95, 96]. Heute werden monoklonale Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle als Induktionstherapie vor der Transplantation gegeben, um einer akuten Abstoßung vorzubeugen.

4.5 T-Zell und Monozyten/Makrophagen Infiltration

Immunhistochemisch waren in diesem Modell R73+-Zellen als ein Marker für T-Zellen bei den nativen Herzen und Transplantaten am ersten postoperativen Tag nicht nachweisbar. An Tag 3 und an Tag 6 kam es zu einer Zunahme von R73+-Zellen in das Transplantat.

Eine Infiltration mit ED-1 positiven Zellen als Marker für Monozyten und Makrophagen, wurden bei den nativen Herzen nicht nachgewiesen. An Tag 1 bis zu Tag 6 kam es zu einer progredienten Infiltration mit ED-1 positiven Zellen in das Transplantat.

Schon *MacPherson & Christmas* konnten 1983 in einem allogenen Rattenherz Transplantationsmodell zeigen, dass es an den Tagen 3, 5 und 7 nach der Transplantation zu einem Anstieg von Makrophagen in das Myokard kam. Auch die Zahl der Lymphozyten stieg während der akuten Abstoßung an, jedoch in geringerem Maße wie Makrophagen [97].

Am Beispiel eines akuten allogenen Nierentransplantations-Abstoßungsmodell der Ratte von *Grau* [98] wurden in der initialen Phase, der frühen Phase und in der Spätphase immunhistochemisch ED-1 positive Zellen und R73 positive Zellen nachgewiesen. In der initialen Phase wurde ein leichter Anstieg von ED1+ Infiltraten nur perivaskulär verzeichnet. In der frühen Phase kam es zu einem starken Anstieg der Infiltrate perivaskulär und im Niereninterstitium. In der Spätphase blieb die Infiltration von ED1+-Zellen konstant. Auch R73+ Infiltrate waren nur leicht perivaskulär in der initialen Phase sichtbar. Die R73+ Infiltrate stiegen in der frühen Phase perivaskulär und im Interstitium an. In der Spätphase kam es zu einem Abfall von R73+-Zellen.

Dies zeigt, dass T-Zellen und Monozyten/Makrophagen sowohl in Herz-, wie auch in Nierentransplantaten im Verlauf der akuten Transplantatabstoßung ansteigen und so zur Destruktion des Transplantates beitragen.

4.6 Interleukine

4.6.1 IL-2

In diesem Modell konnte auf transkriptioneller Ebene die IL-2 Genexpression bei den nativen Tieren und bei den Tieren an Tag 1 nach Transplantation nicht nachgewiesen werden. An Tag 3 ließ sich eine IL-2 Genexpression nachweisen, die an Tag 6 um die Hälfte reduziert war.

Verschiedene experimentelle Studien konnten zeigen, dass die Immunantwort auf ein transplantiertes Organ von Zytokinen reguliert wird [99, 100]. Die Verletzung des Transplantatendothels -durch die Transplantation und den Ischämie/Reperfusionsschaden- führt zur Aktivierung einer komplexen Zytokinkaskade. Interleukin-2 ist dabei eines der wichtigsten Zytokine. IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für Lymphozyten und induziert die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Die IL-2 Gen-Expression an Tag 3 nach Transplantation lässt sich auf die ansteigende T-Zell-Infiltration im Transplantat zurückführen.

In einem Mäuse-Herztransplantationsmodell von *Suzuki* [101] wurde die IL-2 Expression mit Hilfe von RT-PCR untersucht. An Tag 1 konnte eine geringe IL-2 Genexpression nachgewiesen werden. An Tag 3-7 kam es zu einer Hochregulierung des IL-2 Gens. Auch *Dallman* [99] demonstrierte in einem allogenen Mäuse-Herztransplantationsmodell die Genexpression von IL-2 an den Tagen 3 und 6 nach Transplantation. In nicht transplantierten Herzen ließ sich keine IL-2 Genexpression nachweisen.

An Nagetieren und an Affen wurde die akute Abstoßung mit einer vermehrten Th1 Zytokin (IL-2, IFN- γ , TNF- β) mRNA-Expression in Verbindung gebracht. Von diesen Zytokinen wurde angenommen, dass sie für den Abstoßungsprozess von Nieren-, Herzen- und Lebertransplantaten verantwortlich sind [99, 102-104].

Die Transplantatakzeptanz wurde mit einer verminderten Th1 Zytokin-Produktion und einer gesteigerten Th2-Zytokin-Produktion (IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10) assoziiert [105-108].

Mit Hilfe von Knockout-Mäusen konnte man jedoch zeigen, dass Th1 Zytokine für die Transplantatabstoßung nicht erforderlich sind, und Th2 Zytokine nicht nur für die Organakzeptanz verantwortlich gemacht werden können. IL-2 und TNF- γ Knockout-Mäuse stießen ihr Transplantat in Anwesenheit von Th2 Zytokinen ab [109, 110], und IL-4 Knockout-Mäuse akzeptierten das Transplantat in Anwesenheit von Th1 Zytokinen [111]. Diese Studien konnten zeigen, dass sich immunologische Phänomene wie die Transplantatabstoßung und Organakzeptanz nicht strikt in das Th1/Th2 Paradigma einteilen lassen.

Viele Studien konnten zeigen, dass Typ 1 Zytokine bei der Herzabstoßung hochreguliert werden [112-114]. Andere Studien demonstrierten, dass Herztransplantatabstoßungen auch in Abwesenheit von Typ 1 Zytokinen vorkommen [115, 116]. Viele Zytokine, wie z.B. IL-2, unterliegen einer Redundanz, das bedeutet, das in Abwesenheit von IL-2 dessen Funktion von anderen Zytokinen übernommen wird [46].

4.6.2 IL-2 Rezeptor

In diesem Modell konnte auf transkriptioneller Ebene die IL-2 Rezeptor Genexpression sowohl bei den nativen Tieren als auch bei allen anderen Proben mit einem kontinuierlichen Anstieg bis zu Tag 6 nach Transplantation nachgewiesen werden.

Die Interaktion von IL-2 Rezeptor (CD 25) mit IL-2 fördert die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten. Dies führt zu einem raschen Anstieg verschiedener T-Lymphozyten mit Helfer-, Suppressor- und zytotoxischer Aktivität.

Die klinische Relevanz zeigte sich im Modell von *Kupiec-Weglinski*. In einem allogenen Ratten-Herztransplantationsmodell konnte mit dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen den IL-2 Rezeptor eine Verlängerung des Transplantatüberlebens verzeichnet werden [117]. Auch der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Daclizumab gegen den IL-2 Rezeptor als Induktions-Immunsuppression,

konnte die Frequenz der akuten Abstoßungsepisoden bei herztransplantierten Menschen verringern [118].

4.6.3 IL-1

In diesem Modell wurde IL-1 β mit der RT-PCR bei den nativen Tieren nicht nachgewiesen. An Tag 1 kam es zu einer Expression von IL-1 β , die bis zu Tag 6 abfiel. Interleukin-1 spielt eine Schlüsselrolle in der Kaskade der Immunantwort und der Inflammation. Viele Funktionen sind denen von TNF- α gleich. IL-1 aktiviert Lymphozyten, stimuliert die Expression von IL-2R, steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen und steigert die Synthese von Lymphokinen [119, 120]. Lokale Wirkungen von IL-1 zielen auf die Rekrutierung und Aktivierung von immunkompetenten Zellen. Neben direkten chemotaktischen Wirkungen induziert IL-1 Chemokine.

Auch *Dallman* [99] zeigte in einem allogenen Maus-Herztransplantationsmodell, dass IL-1 β mit RT-PCR in normalem Gewebe, syngenem und allogenen Herzgewebe zu detektieren war. Während der akuten Abstoßung kam es in den allogenen Transplantaten zu einem deutlichen Anstieg der IL-1 β Genexpression gegenüber den syngenem Transplantaten.

Frühere Studien konnten zeigen, dass die Kombinationstherapie von niedrig dosiertem Cyclosporin und einem IL-1 Rezeptorantagonisten zu einer signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens führten [121]. In einer anderen allogenen Herztransplantations-Studie der Ratte wurden TNF- α und IL-1 inhibiert und damit das Transplantatüberleben verlängert. Außerdem kam es immunhistochemisch zu einer Suppression von infiltrierenden ED-1 positiven Zellen in das Gewebe [122].

4.6.4 TNF- α

In diesem Modell wurde TNF- α mit Hilfe der RT-PCR bei den nativen Tieren und an Tag 1 nicht nachgewiesen. An Tag 3 kam es zu einer Expression von TNF- α mit einem Anstieg an Tag 6. Der Grad der Expression steigt mit der Anzahl von Monozyten in das Transplantat.

Proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), spielen eine wichtige Rolle in der Abstoßung von transplantierten Organen. Der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) wird von aktivierten Monozyten und Antigen-stimulierten T-Zellen ausgeschüttet. Die physiologische Funktion von TNF- α besteht in der Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten zum Ort der Entzündung, da es in der Lage ist, Chemokine aus Endothel und Makrophagen zu sezernieren. Am Endothel fördert TNF- α die Adhärenz von Granulozyten und damit die Diapedese von weißen Blutkörperchen von der Blutbahn in das Gewebe.

Azzawi [123] dagegen sieht keinen Zusammenhang zwischen der Zunahme der TNF- α Expression und dem Grad der Abstoßung.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen TNF- α das Transplantatüberleben von Rattenherzen verlängert [124-126]. TNF- α fördert die Expression des IL-2 Rezeptors, die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen, steigert die Expression des MHC- Antigens und induziert die Expression von verschiedenen Adhensionsmolekülen auf dem Endothel [127, 128].

4.7 Chemokine

Verschiedene Studien [59, 60, 129-133] konnten demonstrieren, dass Chemokine eine essentielle Rolle in der Regulierung und Koordination der Leukozyten-Infiltration in Transplantate spielen. Chemokine werden in Haut-, Leber-, Lungen-, Herz- und Nierentransplantaten exprimiert, nach Ischämie/Reperfusionsschaden, viraler Infektion und akuter und chronischer Abstoßung. Chemokine spielen eine wichtige Rolle in der akuten Transplantatabstoßung und Entwicklung der Transplantatvaskulopathie. Weiterhin stellt die Quantifizierung der Expression von Chemokinen in Tiermodellen

einen sensitiven diagnostischen Indikator für das Auftreten akuter Abstoßungsepisoden dar, einschließlich der chronischen Transplantatabstoßung sowie andere Formen der Transplantadysfunktion. Zwei repräsentative Chemokine, MCP-1 und RANTES, aus der Gruppe der CC-Chemokine wurden in diesem Modell untersucht.

4.7.1 MCP-1

Die Genexpression des Chemokin MCP-1 konnte in dieser Studie in geringem Maße bei den nativen Tieren detektiert werden. Mit einem 3fachen Anstieg an Tag 1, einem leichten Abfall an Tag 3 und dem Höhepunkt der Genexpression an Tag 6 nach der Transplantation.

Fairchild [60] demonstrierte an einem allogenen Herztransplantationsmodell der Maus an den Tagen 3 und 6, dass MCP-1 an Tag 3 nach der Transplantation mit Northern Blots zu detektieren war. In Isotransplantaten kam es ebenfalls zu einem leichten Anstieg der MCP-1 Genexpression. Auch *Saber* [131] konnte MCP-1 an Tag 1, 5 und 7 nach der Transplantation in allogenen Mausherztransplantaten mit Hilfe der RT-PCR nachweisen.

Yun [132] beschreibt in einem MHC I-mismatch Mäuseherztransplantationsmodell mit Hilfe des Ribonuclease Protection Assays, eine MCP-1 Exprimierung in Isotransplantaten und verstärkt auch in Allotransplantaten an Tag 1 nach Transplantation. Die höhere Transkriptionsrate von MCP-1 in Allotransplantaten spricht dafür, dass der immunvermittelte Prozess einen stärkeren Anstieg der MCP-1 Genproduktion bewirkt, als der Ischämie/Reperfusionsschaden, der für den Anstieg der MCP-1 Produktion bei den Isotransplantaten verantwortlich gemacht wird. An Tag 4 nach der Transplantation kommt es in seinem Modell zu einem Abfall der MCP-1 Genexpression in den Isotransplantaten. Dies wird von *Yun* dadurch erklärt, dass es im Verlauf der akuten Abstoßung zu keinem weiteren Anstieg von Immunzellen in die Isotransplantate kommt. Bei den Allotransplantaten bleibt die MCP-1 Expression dagegen gleich hoch.

Das Auftreten der frühen Chemokin- Kaskade in Iso-und Allotransplantaten wird durch verschiedene Faktoren getriggert. Hierzu zählen das Gewebetrauma, Ischämie/Reperfusionsschaden und oxidativer Stress. Wenige Minuten nach Reperfusion des Transplantats werden proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α und IL-1 vom Endothel- und von parenchymalen-Zellen des Transplantats gebildet. Diese Zytokine stimulieren das Endothel und parenchymale Zellen des Transplantats neutrophile Granulozyten- und Makrophagen-anziehende Chemokine, wie MCP-1 und IL-8 zu bilden. [134].

4.7.2 RANTES

In diesem Modell konnte die Genexpression von RANTES mit Hilfe der RT-PCR in der späten Phase der akuten Abstoßung an Tag 6 nach der Transplantation detektiert werden. Bei den nativen Kontroll-Herzen und den Tagen 1 und 3 nach der Transplantation kam es zu keiner RANTES Gen-Expression.

Dieses Ergebnis ist identisch mit Beobachtungen von *Fairchild* [60], der die Expression von RANTES an Tag 3 nur sehr schwach, an Tag 8 stark in einem allogenen Herz-Transplantationsmodell an Mäusen beschreibt. Auch *Saber* [131] konnte RANTES nach allogener Herztransplantation der Maus an den Tagen 5 und 7 mit Hilfe der RT-PCR nachweisen. *Mulligen* [130] beschreibt eine RANTES-Expressierung bei allogenen Rattenherztransplantaten am 4. und 6. Tag nach Transplantation, und keine Expression bei Isotransplantaten mit Hilfe des Northern Blot Verfahrens. *King* [129] konnte RANTES an Tag 3 und Tag 7 nach Hornhauttransplantation der Ratte mit der RT-PCR Methode nachweisen. Auch *Yun* [133] beschreibt in einem MHC I-mismatch Mäuseherztransplantationsmodell einen Anstieg von RANTES an Tag 4 nach Transplantation in Allotransplantaten, mit einer Hochregulierung an Tag 7 mit dem Ribonuklease Protection Assay. Die RANTES Gen-Expression korrelierte in diesem Modell mit der Makrophagen und T-Lymphozyten Infiltration in das Transplantat. In einer anderen Arbeit von *Yun* [132], in einem MHC II-mismatch Mäuseherztransplantationsmodell konnte ebenfalls mit Hilfe des Ribonuklease

Protection Assays die RANTES Gen-Expression an Tag 4 und 7 detektiert werden. Bei nativen Herzen konnte keine Chemokin-Expression beobachtet werden.

Im Vergleich dazu beschreibt *Nagano* eine frühe Expression des RANTES-Gens nach 24h und einen weiteren Anstieg an Tag 3 und 5 nach Transplantation bei Nierentransplantaten der Ratte [135].

Koga vermutet diese frühe Expression von RANTES 24h nach Nierentransplantation der Ratte, als ein Marker der frühen Infiltration von mononukleären Zellen in das Nierenepithel [59]. Da in Studien an humanen Nierentransplantierten RANTES mRNA von infiltrierten mononukleären Zellen im Tubulusepithel exprimiert wurde [136].

Das Auftreten von RANTES in der späten Phase der akuten Abstoßung wird dadurch erklärt, das RANTES hauptsächlich von aktivierten CD8+-Zellen exprimiert wird, und die Rekrutierung von aktivierten T-Zellen 2-3 Tage dauert [59, 137].

Diese unterschiedlichen Beobachtungen zwischen der frühen Expression von RANTES bei der Nierentransplantation und dem späten Auftreten von RANTES nach Herztransplantation lassen vermuten, dass die Chemokin-Expression organspezifisch ist [57].

In einer Studie von *Beck* [138] konnte gezeigt werden, dass nach einer kutanen Injektion von RANTES beim Menschen die Auswanderung, Adhäsion, transendotheliale Migration, die Vermehrung von Makrophagen, T-Gedächtnis-Zellen, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und natürliche Killerzellen durch RANTES in das Zielgewebe stimuliert werden. Diese Infiltration von Zellen ist assoziiert mit humaner Herzabstoßung [139] und Lungentransplantatabstoßung [140], sowie der chronischen Abstoßung von Nierentransplantaten bei der Ratte [61, 141]. Die Infiltration von RANTES positiven-Zellen korreliert mit dem Grad der akuten Transplantatabstoßung [142]. Auch *Yun* beschreibt in einem allogenen Mäuseherztransplantationsmodell, dass RANTES mit der mononukleären Infiltration des Transplantates korreliert und so die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie einleitet [133]. In Tiermodellen wurde Met-RANTES dem Transplantatempfängern verabreicht, um RANTES zu antagonisieren. In einem Nierentransplantationsmodell wurden so die Leukozyten-Infiltration und die Zytokin-Expression reduziert und die Entwicklung der chronischen Nephropathie signifikant verzögert [143].

4.8 Ausblick

Die akute Transplantatabstoßung wurde bisher hauptsächlich histologisch charakterisiert. Oftmals kann jedoch durch die allein histologische Beurteilung von Endomyokardbiopsien der Aktivierungsgrad immunkompetenter Zellen nicht beurteilt werden. Therapiebedürftige Phasen der akuten Abstoßung und nicht therapiebedürftige milde Phasen der akuten Abstoßung, die durch Ischämie und Reperfusion, wiederholte Probeentnahme an gleicher Stelle oder die immunsuppressive Therapie entstehen, lassen sich histologisch nur schwer voneinander abgrenzen. [33, 144]. Vor diesem Hintergrund erscheint die Einführung zusätzlicher weiterführender Untersuchungen des intrakardialen Gewebes für sinnvoll. Dieses Tiermodell bietet sich an, die histologischen ISHLT-Kriterien mit Hilfe von molekularen Markern weiter zu entwickeln. Dafür wurden Genexpressionsprofile erstellt, um die Expressionskinetik verschiedener Mediatoren der akuten Abstoßung zu bestimmen. Auch könnten immunsuppressive und immunmodulatorische Substanzen in diesem reproduzierbaren Tiermodell auf ihren in- vivo-Effekt hin getestet werden. Die in dieser Arbeit erfolgte kinetische Charakterisierung der molekularen Mediatoren der akuten Transplantatabstoßung erlaubt es, zeit- und zielgerichtete immunmodulierende Therapiestrategien an einem definierten Tiermodell zu entwickeln mit dem Ziel, es in Zukunft auf die klinische Situation übertragen zu können.

5 Zusammenfassung

Die akute Transplantatabstoßung ist eine wesentliche Ursache für Mortalität in den ersten Wochen nach Herztransplantation und beeinflusst Morbidität und Mortalität im Langzeitverlauf.

Die akute Transplantatabstoßung ist charakterisiert durch die Infiltration von immunkompetenten mononukleären Zellen in das Transplantat. Es kommt zur Aktivierung von Adhäsionsmolekülen sowie zur Aktivierung verschiedener Zellpopulationen, die eine Reihe von Zytokinen exprimieren. In dieser Arbeit wurden Mediatoren der akuten Abstoßung in der Früh-, Intermediär- und der Spätphase der Abstoßung auf histologischer, immunhistochemischer und Genexpressionsebene im Modell der herztransplantierten Ratte analysiert (Zusammenfassung siehe Abbildung 21).

Herzen von Wistar-Furth (WF) Spenderratten wurden heterotop in Lewis (LEW) Empfängerratten transplantiert. Die akute Transplantatabstoßung erfolgte innerhalb von 7 Tagen. Die Transplantate wurden 1, 3 und 6 Tage nach Herztransplantation untersucht. In der Standard H&E Färbung kam es histologisch zu einer progredienten Infiltration von mononukleären Zellen in das Transplantat. Bereits am Tag 1 nach Transplantation ist eine Hochregulierung der ICAM-1 und VCAM-1 Expression auf immunhistochemischer Ebene vor allem in postkapillären Venolen nachweisbar. Die Induktion dieser Adhäsionsmoleküle geht einher mit einer beginnenden zellulären Infiltration mit differenzierten alpha/beta-T-Zell Rezeptor positive Zellen (R73) sowie Monozyten und Makrophagen (ED1), die am Tag 6 ihr Maximum erreicht haben. In der semiquantitativen RT-PCR zeigt sich keine Expression von Adhäsionsmolekülen bei den nativen Kontrollherzen, dagegen kam es bei den transplantierten Herzen zu einem weiteren Anstieg der ICAM-1 und VCAM-1 mRNA Expression von Tag 1 bis zu Tag 3. In der Intermediärphase, an Tag 3 erreicht auch die Expression von IL-2 und MCP-1 mRNA ihr Maximum, während TNF- α und RANTES erst in der Spätphase der Abstoßung (Tag 6) maximal exprimiert werden.

Zusätzlich kommt es in der Frühphase der akuten Abstoßung auf transkriptioneller Ebene zu einer maximalen Expression von IL-1 β . Ebenso lässt sich der IL-2 Rezeptor, auf mRNA-Ebene schon bei den nativen Kontrollherzen nachweisen und steigt kontinuierlich bis zum Tag 6 nach Transplantation an.

Die kinetische Charakterisierung von molekularen Mediatoren der akuten Transplantatabstoßung ermöglicht es, die akute Transplantatabstoßung hinsichtlich des Aktivierungsgrades von immunkompetenten Zellen in Endomyokardbiopsien über die rein histologisch und immunhistochemischen Methoden hinaus weiter zu kennzeichnen. Zusätzlich lassen sich in diesem definierten Tiermodell zeit- und zielgerichtete immunmodulierende Therapiestrategien evaluieren.

Abbildung 21: Akute Transplantatabstoßung

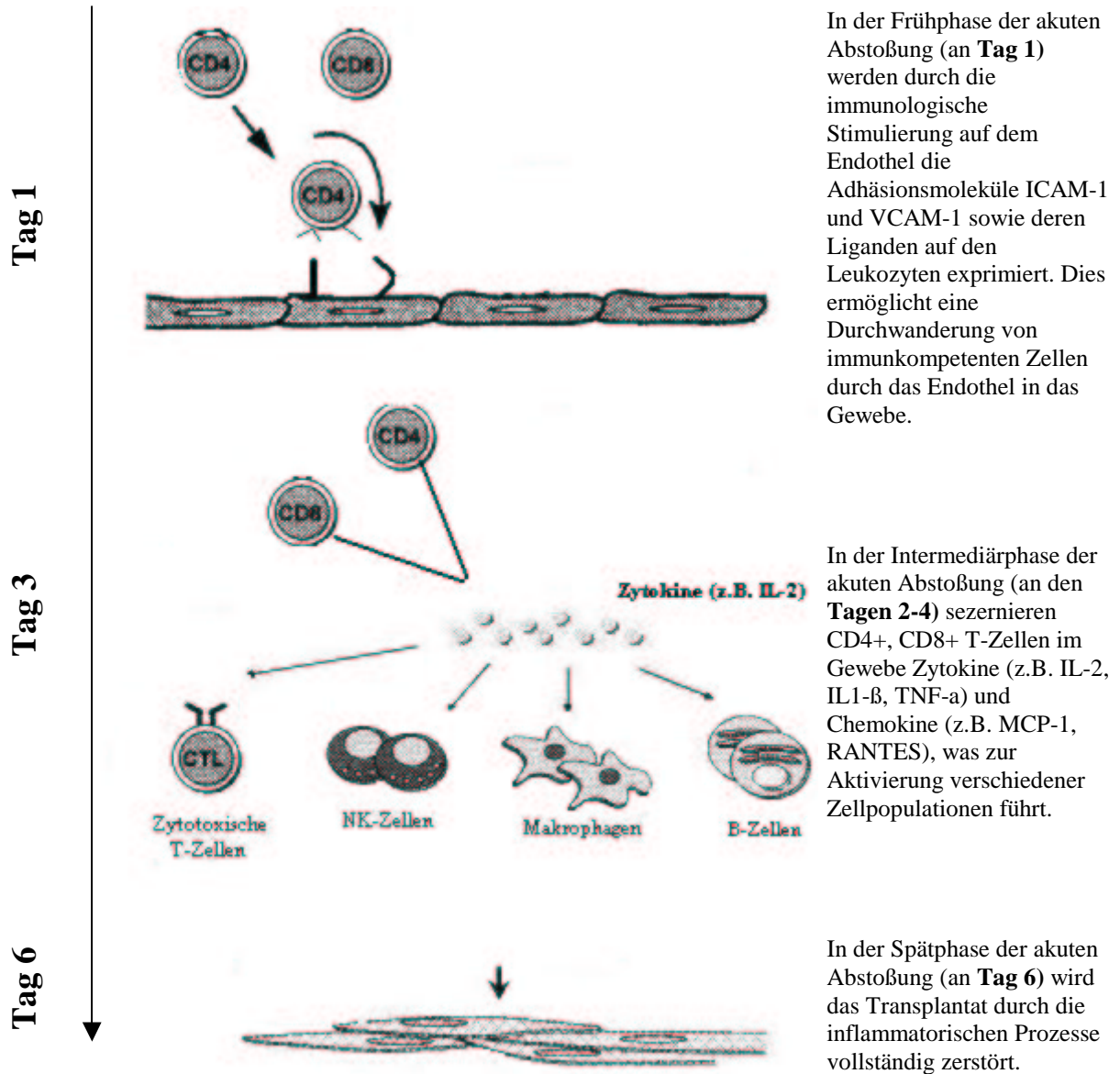


Abb. 21: Vereinfachte schematische Darstellung der akuten Transplantatabstoßung im zeitlichen Verlauf.

6. Summary

Acute cardiac allograft rejection is a substantial cause for mortality after heart transplantation and affects long term morbidity and mortality after successful transplantation. Clinical acute rejection is characterised by deterioration of graft function. Histologically it is characterised by progressive infiltration with immune competent mononuclear cells. This is mediated by the expression of adhesion molecules as well as secretion of cytokines.

The aim of this study is to evaluate expression patterns of different adhesion molecules and cytokines in the early, intermediate and late phase of acute cardiac allograft rejection. Therefore, mediators of acute cardiac allograft rejection were analysed sequentially during the time course of rejection by histology, immunohistochemistry and gene expression profiling by RT-PCR in a heterotopic cardiac allograft model in the rat.

Hearts of Wistar Furth (WF) donor rats were transplanted heterotopically to the infrarenal great vessels of Lewis (LEW) recipient rats. This is a fully allogeneic cardiac transplant model, leading to complete acute cardiac allograft rejection with cessation of graft function within 7 days. For further examination functioning allografts were removed on day 1, 3 and 6 after engraftment.

In standard H&E histology a progressive infiltration with mononuclear cells could be detected during the time course within progression of acute allograft rejection. On day 1 after transplantation, upregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression was detected by immunohistology particularly on post-capillary venules. The expression of these adhesion molecules on endothelial cells, as a marker for the early phase of rejection, was accompanied by a progressive infiltration with alpha/beta T-cell-receptor-positive cells (R73) as well as ED-1 positive monocytes and macrophages. Maximal infiltration was observed on the day 6 after engraftment. Semiquantitative RT-PCR revealed no expression of adhesion molecules on the transcriptional level in naive control hearts, whereas ICAM-1 was detectable on day 1 after engraftment with a further rise at day 3 after engraftment. VCAM-1 was detectable on day 3 after transplantation.

As a marker for the intermediate phase of cardiac allograft rejection, IL-2 and MCP-1 mRNA expression was analysed. These cytokines reached their maximum expression on day 3 after transplantation.

During the late phase of allograft rejection TNF-alpha and RANTES were evaluated on the transcriptional level. They reached their maximum expression on day 6 after engraftment.

In addition during the early phase of acute cardiac allograft rejection on day 1 IL-1 β reaches its maximum expression on the mRNA expression level. The IL-2 receptor is already expressed in naive control hearts and its expression rises continuously up to day 6 after transplantation.

The kinetical characterization of molecular mediators during the time course of acute cardiac allograft rejection provides further opportunities to characterize acute rejection with regard to the degree of immunological activation of the infiltration immune competent cells to the bare histological or immunohistological characterization. Moreover it provides the framework for in vivo screening of immunosuppressive or immunomodulatory agents.

Literaturverzeichnis

1. Carrel, D., Operative Technic of Vascular Anastomoses and Visceral Transplantation. Lyon Med, 1964; 212: 1561-8.
2. Murray, J.E., J.P. Merrill, and J.H. Harrison, Renal homotransplantation in identical twins. 1955. J Am Soc Nephrol, 2001; 12(1): 201-4.
3. Gibson and Medawar, Fate of skin homografts in man. J Anat, 1942 ; 77:299.
4. Billingham, R.E., P.L. Krohn, and P.B. Medawar, Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. Br Med J, 1951; 4716: 1157-63.
5. Dausset, J., [Iso-leuko-antibodies.]. Acta Haematol, 1958; 20(1-4): 156-66.
6. Taylor, D.O., et al., The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004. J Heart Lung Transplant, 2004; 23(7): 796-803.
7. Taylor, D.O., et al., The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twentieth official adult heart transplant report--2003. J Heart Lung Transplant, 2003; 22(6): 616-24.
8. Costanzo, M.R., et al., Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant, 1998; 17(8): 744-53.
9. Kobashigawa, J.A., et al., Pretransplantation risk factors for acute rejection after heart transplantation: a multiinstitutional study. The Transplant Cardiologists Research Database Group. J Heart Lung Transplant, 1993; 12(3): 355-66.
10. Hauptman, P.J., et al., Acute rejection: culprit or coincidence in the pathogenesis of cardiac graft vascular disease? J Heart Lung Transplant, 1995; 14(6 Pt 2): 173-80.
11. Tilney, N.L., et al., Transplantation immunology: an introduction. Transpl Immunol, 1994; 2(2): 99-102.
12. Taylor, P.M., et al., Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac allografts. Transplantation, 1992; 54(3): 451-7.
13. Orbaek Andersen, H., Heart allograft vascular disease: an obliterative vascular disease in transplanted hearts. Atherosclerosis, 1999; 142(2): 243-63.
14. Azuma, H., L.C. Paul, and N.L. Tilney, Insights into acute and chronic rejection. Transplant Proc, 1996; 28(4): 2081-4.
15. Oh-Ishi, T., et al., The interaction of interleukin 2 with its receptor in the generation of suppressor T cells in antigen-specific and antigen-nonspecific systems in vitro. Clin Immunol Immunopathol, 1989; 52(3): 447-59.
16. Le Moine, A., M. Goldman, and D. Abramowicz, Multiple pathways to allograft rejection. Transplantation, 2002; 73(9): 1373-81.
17. Waldmann, H. and S. Cobbold, Monoclonal antibodies for the induction of transplantation tolerance. Curr Opin Immunol, 1993; 5(5): 753-8.
18. Platt, J.L., et al., Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. Transplantation, 1991; 52(2): 214-20.
19. Platt, J.L. and F.H. Bach, The barrier to xenotransplantation. Transplantation, 1991; 52(6): 937-47.

20. Chapman, J.R., et al., Hyperacute rejection of a renal allograft in the presence of anti-HLA-Cw5 antibody. *Transplantation*, 1986; 42(1): 91-3.
21. Jordan, S.C., et al., Hyperacute allograft rejection mediated by anti-vascular endothelial cell antibodies with a negative monocyte crossmatch. *Transplantation*, 1988; 46(4): 585-7.
22. Schuurman, H.J., et al., Acute humoral rejection after heart transplantation. *Transplantation*, 1988; 46(4): 603-5.
23. Tullius, S.G. and N.L. Tilney, Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation*, 1995; 59(3): 313-8.
24. Weis, M. and W. von Scheidt, Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation*, 1997; 96(6): 2069-77.
25. Ardehali, A., et al., Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*, 1995; 92(3): 450-6.
26. Labarrere, C.A., et al., Coronary artery disease in cardiac allografts: association with arteriolar endothelial HLA-DR and ICAM-1 antigens. *Transplant Proc*, 1995; 27(3): 1939-40.
27. Duquesnoy, R.J. and A.J. Demetris, Immunopathology of cardiac transplant rejection. *Curr Opin Cardiol*, 1995; 10(2): 193-206.
28. Gao, S.Z., et al., Retransplantation for severe accelerated coronary artery disease in heart transplant recipients. *Am J Cardiol*, 1988; 62(13): 876-81.
29. Gao, S.Z., et al., Clinical and laboratory correlates of accelerated coronary artery disease in the cardiac transplant patient. *Circulation*, 1987; 76(5 Pt 2): V56-61.
30. Billingham, M.E., Endomyocardial biopsy detection of acute rejection in cardiac allograft recipients. *Heart Vessels Suppl*, 1985; 1: 86-90.
31. Sibley, R.K., et al., Endomyocardial biopsy in the cardiac allograft recipient. A review of 570 biopsies. *Ann Surg*, 1986; 203(2): 177-87.
32. Caves, P.K., et al., Diagnosis of human cardiac allograft rejection by serial cardiac biopsy. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1973; 66(3): 461-6.
33. Billingham, M.E., et al., A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant*, 1990; 9(6): 587-93.
34. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 1994; 84(7): 2068-101.
35. Lemstrom, K., P. Koskinen, and P. Hayry, Induction of adhesion molecules on the endothelia of rejecting cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant*, 1995; 14(2): 205-13.
36. Carlos, T., et al., Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on endothelium during acute rejection in human cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant*, 1992; 11(6): 1103-8; discussion 1109.
37. Orosz, C.G., et al., Role of the endothelial adhesion molecule VCAM in murine cardiac allograft rejection. *Immunol Lett*, 1992; 32(1): 7-12.
38. van de Stolpe, A. and P.T. van der Saag, Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*, 1996; 74(1): 13-33.

39. Gearing, A.J. and W. Newman, Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*, 1993; 14(10): 506-12.
40. Bevilacqua, M.P., et al., Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 1989; 243(4895): 1160-5.
41. Denton, M.D., et al., The role of the graft endothelium in transplant rejection: evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. *Pediatr Transplant*, 2000; 4(4): 252-60.
42. Gillis, S., et al., T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol*, 1978; 120(6): 2027-32.
43. Mosmann, T.R., et al., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986; 136(7): 2348-57.
44. Romagnani, S., Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today*, 1991; 12(8): 256-7.
45. Nickerson, P., et al., Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol*, 1994; 6(5): 757-64.
46. Baan, C.C. and W. Weimar, Intra-graft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation. *Transpl Int*, 1998; 11(3): 169-80.
47. Depper, J.M., et al., Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82(12): 4230-4.
48. Abbas, L., Pober, Cellular and Molecular Immunology. 2000: W.B. Saunders Company.
49. Kovacs, E.J., et al., IL-2 induction of IL-1 beta mRNA expression in monocytes. Regulation by agents that block second messenger pathways. *J Immunol*, 1989; 143(11): 3532-7.
50. Bevilacqua, M.P., et al., Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol*, 1985; 121(3): 394-403.
51. Abbas, Cellular and Molecular Immunology, ed. 4th. 2000: Saunders Company.
52. Ellery, J.M. and P.J. Nicholls, Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002; 13(1): 27-40.
53. Dinarello, C.A., The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J*, 1994; 8(15): 1314-25.
54. Rollins, B.J., Chemokines. *Blood*, 1997; 90(3): 909-28.
55. Murphy, P.M., et al., International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 2000; 52(1): 145-76.
56. Cochran, B.H., A.C. Reffel, and C.D. Stiles, Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell*, 1983; 33(3): 939-47.
57. Melter, M., et al., Current understanding of chemokine involvement in allograft transplantation. *Pediatr Transplant*, 1999; 3(1): 10-21.
58. Schall, T.J., Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*, 1991; 3(3): 165-83.
59. Koga, S., et al., CD8+ T cells produce RANTES during acute rejection of murine allogeneic skin grafts. *Transplantation*, 1999; 67(6): 854-64.

60. Fairchild, R.L., et al., Expression of chemokine genes during rejection and long-term acceptance of cardiac allografts. *Transplantation*, 1997; 63(12): 1807-12.
61. Nadeau, K.C., H. Azuma, and N.L. Tilney, Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92(19): 8729-33.
62. Ono, K. and E.S. Lindsey, Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1969; 57(2): 225-9.
63. Schmid, C., et al., Successful heterotopic heart transplantation in rat. *Microsurgery*, 1994; 15(4): 279-81.
64. Abbott, C.P., et al., A Technique for Heart Transplantation in the Rat. *Arch Surg*, 1964; 89: 645-52.
65. Tomita, F., Heart homotransplantation in the rat. *Sapporo Igaku Zasshi*, 1966; 30(4): 165-83.
66. Herreros, J. and P. Errasti, A new technique of heterotopic heart transplantation in rats. *Ann Ital Chir*, 1991; 62(6): 573-5.
67. Oesterwitz, H., Heart transplantation in the rat: experience with a modified technique of heterotopic grafting. *Z Versuchstierkd*, 1990; 33(5): 211-5.
68. Cordell, J.L., et al., Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*, 1984; 32(2): 219-29.
69. Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987; 162(1): 156-9.
70. Mullis, K.B., Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1990; 48(8): 579-82.
71. Segel, L.D., et al., Selective overexpression of inflammatory molecules in hearts from brain-dead rats. *J Heart Lung Transplant*, 2002; 21(7): 804-11.
72. Taal, M.W., et al., Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney Int*, 2000; 58(4): 1664-76.
73. Grandel, U., et al., Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation*, 2000; 102(22): 2758-64.
74. Medawar, P.B., The behaviour and fate of skin homografts in rabbits. *J Anat*, 1944; 79: 157-176.
75. Tilney, N.L., et al., Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats. *Transplantation*, 1975; 20(4): 323-30.
76. Mason, D.W. and P.J. Morris, Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu Rev Immunol*, 1986; 4: 119-45.
77. Tullius, S.G., et al., Binding of lymphocytes to acutely rejecting rat kidney allografts in vitro is guided by events in the graft itself rather than by sensitization of host lymphocytes. *Transpl Immunol*, 1995; 3(2): 91-7.
78. Heemann, U.W., et al., Adhesion molecules and transplantation. *Ann Surg*, 1994; 219(1): 4-12.

79. Suranyi, M.G., et al., Lymphocyte adhesion molecules in T cell-mediated lysis of human kidney cells. *Kidney Int*, 1991; 39(2): 312-9.
80. Brockmeyer, C., et al., Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation*, 1993; 55(3): 610-5.
81. Adams, D.H., et al., Intercellular adhesion molecule 1 on liver allografts during rejection. *Lancet*, 1989; 2(8672): 1122-5.
82. Mues, B., et al., Diagnostic assessment of macrophage phenotypes in cardiac transplant biopsies. *Eur Heart J*, 1991; 12 Suppl D: 32-5.
83. Pelletier, R.P., et al., Importance of endothelial VCAM-1 for inflammatory leukocytic infiltration in vivo. *J Immunol*, 1992; 149(7): 2473-81.
84. Briscoe, D.M., et al., Predictive value of inducible endothelial cell adhesion molecule expression for acute rejection of human cardiac allografts. *Transplantation*, 1995; 59(2): 204-11.
85. Briscoe, D.M., R.S. Cotran, and J.S. Pober, Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration. *J Immunol*, 1992; 149(9): 2954-60.
86. Briscoe, D.M., et al., Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human renal allografts. *J Am Soc Nephrol*, 1992; 3(5): 1180-5.
87. Alpers, C.E., et al., Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in kidney allograft rejection. *Kidney Int*, 1993; 44(4): 805-16.
88. Fuggle, S.V., et al., Variation in expression of endothelial adhesion molecules in pretransplant and transplanted kidneys--correlation with intra-graft events. *Transplantation*, 1993; 55(1):117-23.
89. Briscoe, D.M., et al., Induced expression of endothelial-leukocyte adhesion molecules in human cardiac allografts. *Transplantation*, 1991; 51(2): 537-9.
90. Ferran, C., et al., Implications of de novo ELAM-1 and VCAM-1 expression in human cardiac allograft rejection. *Transplantation*, 1993; 55(3): 605-9.
91. Wolff, B., et al., Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med*, 1998; 188(9):1757-62.
92. Qian, Z., et al., Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection. *Circulation*, 2001; 104(19): 2369-75.
93. Cook-Mills, J.M., VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol*, 2002; 39(9): 499-508.
94. Isobe, M., et al., Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science*, 1992; 255(5048): 1125-7.
95. Pelletier, R., et al., Monoclonal antibody to anti-VCAM-1 interferes with murine cardiac allograft rejection. *Transplant Proc*, 1993; 25(1 Pt 1): 839-41.
96. Orosz, C.G., et al., Treatment with anti-vascular cell adhesion molecule 1 monoclonal antibody induces long-term murine cardiac allograft acceptance. *Transplantation*, 1993; 56(2): 453-60.
97. MacPherson, G.G. and S.E. Christmas, The role of the macrophage in cardiac allograft rejection in the rat. *Immunol Rev*, 1984; 77: 143-66.

98. Grau, V., B. Herbst, and B. Steiniger, Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell Tissue Res*, 1998; 291(1): 117-26.
99. Dallman, M.J., C.P. Larsen, and P.J. Morris, Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med*, 1991; 174(2): 493-6.
100. Halloran, P.F., et al., The molecular immunology of acute rejection: an overview. *Transpl Immunol*, 1993; 1(1): 3-27.
101. Suzuki, J., et al., Sensitive diagnosis of cardiac allograft rejection by detection of cytokine transcription in situ. *Cardiovasc Res*, 1998; 40(2): 307-13.
102. Morgan, C.J., et al., Alloantigen-dependent endothelial phenotype and lymphokine mRNA expression in rejecting murine cardiac allografts. *Transplantation*, 1993; 55(4): 919-24.
103. Thai, N.L., et al., Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. Graft rejection is associated with augmented TH1 function. *Transplantation*, 1995; 59(2): 274-81.
104. Wu, C.J., et al., Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts. *Transplantation*, 1992; 54(2): 326-32.
105. Bugeon, L., et al., Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation*, 1992; 54(2): 219-25.
106. Chen, N. and E.H. Field, Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation*, 1995; 59(7): 933-41.
107. Sayegh, M.H., et al., CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med*, 1995; 181(5): 1869-74.
108. Takeuchi, T., R.P. Lowry, and B. Konieczny, Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation*, 1992; 53(6): 1281-94.
109. Saleem, S., et al., Acute rejection of vascularized heart allografts in the absence of IFNgamma. *Transplantation*, 1996; 62(12): 1908-11.
110. Steiger, J., et al., IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol*, 1995; 155(1): 489-98.
111. Mottram, P.L., et al., Cardiac allografts from IL-4 knockout recipients: assessment of transplant arteriosclerosis and peripheral tolerance. *J Immunol*, 1998; 161(2): 602-9.
112. Baan, C.C., et al., Cytokine mRNA expression in endomyocardial biopsies during acute rejection from human heart transplants. *Clin Exp Immunol*, 1994; 97(2): 293-8.
113. Cunningham, D.A., et al., Local production of cytokines in the human cardiac allograft. A sequential study. *Transplantation*, 1994; 57(9): 1333-7.
114. Grant, S.C., et al., Expression of cytokine messenger RNA after heart transplantation: relationship with rejection and serum cytokines. *Transplantation*, 1996; 62(7): 910-6.

115. Lagoo, A.S., et al., Semiquantitative measurement of cytokine messenger RNA in endomyocardium and peripheral blood mononuclear cells from human heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, 1996; 15(2): 206-17.
116. Martinez, O.M., et al., Intragraft cytokine profile during human liver allograft rejection. *Transplantation*, 1992; 53(2): 449-56.
117. Kupiec-Weglinski, J.W., et al., Therapy with monoclonal antibody to interleukin 2 receptor spares suppressor T cells and prevents or reverses acute allograft rejection in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986; 83(8): 2624-7.
118. Beniaminovitz, A., et al., Prevention of rejection in cardiac transplantation by blockade of the interleukin-2 receptor with a monoclonal antibody. *N Engl J Med*, 2000; 342(9): 613-9.
119. Dinarello, C.A., Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991; 77(8): 1627-52.
120. Dinarello, C.A., Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996; 87(6): 2095-147.
121. Shiraishi, M., et al., The inhibitor cytokine interleukin-1 receptor antagonist synergistically augments cyclosporine immunosuppression in a rat cardiac allograft model. *J Surg Res*, 1995; 58(5): 465-70.
122. Sano, I., et al., Prolonged survival of rat cardiac allograft with proinflammatory cytokine inhibitor. *J Heart Lung Transplant*, 2001; 20(5): 583-9.
123. Azzawi, M., et al., Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism and death due to acute cellular rejection in a subgroup of heart transplant recipients. *Hum Immunol*, 2001; 62(2): 140-2.
124. Imagawa, D.K., et al., The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. II. Evidence that antibody therapy against tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin enhances cardiac allograft survival in rats. *Transplantation*, 1990; 50(2): 189-93.
125. Bolling, S.F., S.L. Kunkel, and H. Lin, Prolongation of cardiac allograft survival in rats by anti-TNF and cyclosporine combination therapy. *Transplantation*, 1992; 53(2): 283-6.
126. Coito, A.J., et al., Anti-TNF-alpha treatment down-regulates the expression of fibronectin and decreases cellular infiltration of cardiac allografts in rats. *J Immunol*, 1995; 154(6): 2949-58.
127. Poher, J.S., et al., Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*, 1986; 137(6): 1893-6.
128. Neumann, B., et al., Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J Immunol*, 1996; 156(4): 1587-93.
129. King, W.J., et al., Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation. *Transplantation*, 2000; 70(8): 1225-33.
130. Mulligan, M.S., et al., Role of RANTES in experimental cardiac allograft rejection. *Exp Mol Pathol*, 2000; 69(3): 167-74.
131. Saber, L.T., et al., Chemokine profile during allogeneic heart transplant rejection. *Transplant Proc*, 1999; 31(7): 2978-81.

132. Yun, J.J., et al., Early and late chemokine production correlates with cellular recruitment in cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*, 2000; 69(12): 2515-24.
133. Yun, J.J., et al., Rantes production during development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*, 2001; 71(11): 1649-56.
134. el-Sawy, T., N.M. Fahmy, and R.L. Fairchild, Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol*, 2002; 14(5): 562-8.
135. Nagano, H., et al., Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats. *Transplantation*, 1997; 63(8): 1101-8.
136. Pattison, J., et al., RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet*, 1994; 343(8891): 209-11.
137. Watarai, Y., et al., Intraallograft chemokine RNA and protein during rejection of MHC-matched/multiple minor histocompatibility-disparate skin grafts. *J Immunol*, 2000; 164(11): 6027-33.
138. Beck, L.A., et al., Cutaneous injection of RANTES causes eosinophil recruitment: comparison of nonallergic and allergic human subjects. *J Immunol*, 1997; 159(6): 2962-72.
139. Ibrahim, S., et al., Differential infiltration by CD45RO and CD45RA subsets of T cells associated with human heart allograft rejection. *Am J Pathol*, 1993; 142(6): 1794-803.
140. Monti, G., et al., Intrapulmonary production of RANTES during rejection and CMV pneumonitis after lung transplantation. *Transplantation*, 1996; 61(12): 1757-62.
141. Michaels, P.J., et al., Differential expression of RANTES chemokine, TGF-beta, and leukocyte phenotype in acute cellular rejection and quilty B lesions. *J Heart Lung Transplant*, 2001; 20(4): 407-16.
142. Fahmy, N.M., et al., Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants. *Transplantation*, 2003; 75(1): 72-8.
143. Song, E., et al., Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*, 2002; 61(2): 676-85.
144. Schowengerdt, K.O., et al., Diagnosis, surveillance, and epidemiologic evaluation of viral infections in pediatric cardiac transplant recipients with the use of the polymerase chain reaction. *J Heart Lung Transplant*, 1996; 15(2):111-23.

Appendix

Die Statistik wurde mit dem Kruskal-Wallis Test berechnet. Dieser Test prüft die Nullhypothese, dass p Populationen sich nicht unterscheiden. Dabei werden keine Voraussetzungen an die Grundverteilung der Population (nicht parametrisch) gemacht.

Werte der Immunhistochemie:

	R-73 positive Zellen	ED-1 positive Zellen
MW \pm SEM Nativ	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1
MW \pm SEM Tag 1	0,1 \pm 0,1	3,1 \pm 0,4
MW \pm SEM Tag 3	11,3 \pm 1,7	19,8 \pm 1,3
MW \pm SEM Tag 6	29,6 \pm 2,0	31,6 \pm 0,9
Nativ vs. Tag 1	p \leq 0,8224	p<0,0001
Nativ vs. Tag 3	p<0,0001	p<0,0001
Nativ vs. Tag 6	p<0,0001	p<0,0001
Tag 1 vs. Tag 3	p<0,0001	p<0,0001
Tag 1 vs. Tag 6	p<0,0001	p<0,0001
Tag 3 vs. Tag 6	p<0,0001	p<0,0001

	ICAM-1	VCAM-1
Nativ vs. Tag 1	p<0,0001	p<0,0001
Nativ vs. Tag 3	p=0,2503	p<0,0001
Tag 1 vs. Tag 3	p<0,0001	p<0,0001

Werte der RT-PCR:

	ICAM-1	VCAM-1
MW \pm SEM Nativ	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
MW \pm SEM Tag 1	0,29 \pm 0,04	0,0 \pm 0,0
MW \pm SEM Tag 3	0,48 \pm 0,05	0,25 \pm 0,03
Nativ vs. Tag 1	p<0,0001	p>0,9999
Nativ vs. Tag 3	p<0,0001	p<0,0001
Tag 1 vs. Tag 3	p=0,0367	p<0,0001

	IL-2	IL-2 Rezeptor
MW \pm SEM Nativ	0,0 \pm 0,0	0,26 \pm 0,05
MW \pm SEM Tag 1	0,0 \pm 0,0	0,37 \pm 0,05
MW \pm SEM Tag 3	0,81 \pm 0,12	0,40 \pm 0,04
MW \pm SEM Tag 6	0,48 \pm 0,05	0,53 \pm 0,07
Nativ vs. Tag 1	p>0,9999	p=0,3375
Nativ vs. Tag 3	p=0,0413	p=0,0475
Nativ vs. Tag 6	p=0,0404	p=0,0057
Tag 1 vs. Tag 3	p=0,0212	p=0,8797
Tag 1 vs. Tag 6	p=0,0208	p=0,2794
Tag 3 vs. Tag 6	p=0,2906	p=0,6922

	IL-1 beta	TNF-alpha
MW \pm SEM Nativ	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
MW \pm SEM Tag 1	0,49 \pm 0,05	0,0 \pm 0,0
MW \pm SEM Tag 3	0,37 \pm 0,05	0,16 \pm 0,01
MW \pm SEM Tag 6	0,29 \pm 0,04	0,28 \pm 0,01
Nativ vs. Tag 1	p<0,0001	p>09999
Nativ vs. Tag 3	p<0,0001	p=0,0102
Nativ vs. Tag 6	p<0,0001	p=0,011
Tag 1 vs. Tag 3	p=0,4247	p=0,0102
Tag 1 vs. Tag 6	p=0,0576	p=0,011
Tag 3 vs. Tag 6	p=0,523	p=0,0188

	MCP-1	RANTES
MW \pm SEM Nativ	0,19 \pm 0,02	0,0 \pm 0,0
MW \pm SEM Tag 1	0,6 \pm 0,08	0,0 \pm 0,0
MW \pm SEM Tag 3	0,48 \pm 0,06	0,0 \pm 0,0
MW \pm SEM Tag 6	0,7 \pm 0,09	0,4 \pm 0,04
Nativ vs. Tag 1	p=0,0073	p>09999
Nativ vs. Tag 3	p=0,001	p>09999
Nativ vs. Tag 6	p=0,0004	p<0,0001
Tag 1 vs. Tag 3	p=0,7549	p>09999
Tag 1 vs. Tag 6	p=0,9119	p<0,0001
Tag 3 vs. Tag 6	p=0,2691	p<0,0001

Erklärung

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Pia Kranich

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Kranich
Vorname:	Pia
Geburtsdatum/ -ort:	10.02.1976, Friedberg/Hessen
Anschrift:	Memeler Strasse 9 35510 Butzbach
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1980–1986	Grundschule, Stadtschule Butzbach
1986–1988	Förderstufe, Stadtschule Butzbach
1988–1995	Weidig Gymnasium, Butzbach
	Abschluss: Allgem. Hochschulreife

Beruflicher Werdegang

01.09.95-30.01.98	Ausbildung zur Biologielaborantin, ASTA Medica AG, Frankfurt/Main
März 1998-November 2004	Studium der Humanmedizin an der Justus- Liebig Universität Gießen
April 2005	Assistenzärztin am Zentrum für Dermatologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen

Dissertation

PD Dr. H. Hölschermann,
Kardiologisches Labor, Zentrum für Innere
Medizin, Abteilung Kardiologie/Angiologie,
Medizinische Klinik I,
Universitätsklinikum Gießen

**Posterbeitrag im Rahmen
der Promotionsarbeit**

T. Stadlbauer, P. Kranich, H. Hölschermann
„Kinetik der immunologischen Mediatoren
bei der akuten Transplantatabstoßung“
71. Jahrestagung der DGK in Mannheim
2005 (Deutsche Gesellschaft für
Kardiologie). Zeitschrift für Kardiologie,
Band 94, Supplement 1, 2005.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Th. Stadlbauer, der mich tatkräftig bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützte. Er erwies sich als ein sehr engagierter und äußerst hilfsbereiter Betreuer. Herr Dr. Stadlbauer hat mir jederzeit bei Problemen und Fragen zur Verfügung gestanden und mir ermöglicht, eigene Ideen zu verwirklichen. Er war stets geduldig und motivierte mich auch nach zahlreichen Rückschlägen.

Den medizinisch technischen Assistentinnen, Frau B. Parviz und Frau A. Staubitz möchte ich für die große Hilfe und die sehr entgegenkommende Unterstützung bei den Versuchen danken. Ohne die freundliche Art und die immer wieder motivierenden Worte wäre diese Arbeit nicht verwirklicht worden.

Herrn PD Dr. med. H. Hölschermann danke ich für die Möglichkeit, die Versuche in seinem Labor durchführen zu können. Für die wissenschaftlichen Anregungen bin ich Herrn Dr. Hölschermann sehr dankbar.

Für die permanente Unterstützung während des Studiums und während der Durchführung dieser Arbeit gebührt meiner Mutter und Christian ein ganz besonderer Dank.